



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Edith RENAUD-GABARDOS

le mercredi 14 décembre 2016

Titre :

Développement préclinique d'une thérapie génique pro-angiogénique
combinée de l'ischémie cardiaque et du membre inférieur

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

INSERM U1048 - I2MC

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Anne-Catherine PRATS

Pr. Angelo PARINI

Jury :

Dr. Els VERHOEYEN

Directrice de recherche ENS de Lyon

Rapporteur

Dr. Jean-Sébastien SILVESTRE

Directeur de recherche UMR 689 Paris 5

Rapporteur

Dr. Michel PUCEAT

Directeur de recherche UMR S910 Marseille

Examineur

Pr. Jérôme RONCALLI

PU-PH Cardiologue CHU/UPS Toulouse

Président du Jury

Dr. Anne-Catherine PRATS

Directrice de recherche U1048 Toulouse

Co-directrice de thèse

Pr. Angelo PARINI

PU-PH Cardiologue CHU/U1048 Toulouse

Co-directeur de thèse

Résumé

En dépit des avancées considérables dans les traitements pharmacologiques et chirurgicaux de l'ischémie critique des membres inférieurs et de l'insuffisance cardiaque ischémique, ces pathologies demeurent un problème majeur de santé publique. La thérapie génique angiogénique est apparue comme une approche attractive pour restaurer la perfusion du tissu ischémique alors que le transfert de gènes non angiogéniques permet de rétablir la fonction contractile cardiaque. Cependant la thérapie génique utilisant un seul gène thérapeutique a produit jusque là des résultats modestes en clinique; la thérapie combinée apparaît alors comme une stratégie plus prometteuse.

L'efficacité de la thérapie génique nécessite des vecteurs de transfert de gènes optimisés, notamment pour fonctionner dans des conditions de stress où la traduction de la majorité des ARNm cellulaires est bloquée. En réponse au stress, un petit nombre d'ARNm est traduit par un mécanisme alternatif impliquant des IRES (Internal Ribosome Entry Site), éléments structuraux des ARNm pouvant être considérés comme des activateurs traductionnels. Les IRES constituent de plus des outils biotechnologiques permettant de construire des cassettes d'expression dites "multicistroniques" exprimant des combinaisons de molécules thérapeutiques.

La première étape de ma thèse a porté sur l'étude de la régulation de l'IRES du FGF1 (Fibroblast Growth Factor 1), identifié au laboratoire pour sa forte activité dans les cellules musculaires qui en fait un outil de choix pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique ou cardiaque. Cette partie plus fondamentale nous a amenés à identifier deux protéines liées à l'IRES et au promoteur : hnRNPM et p54^{nrb}. L'inhibition et la surexpression de ces protéines ont permis de démontrer qu'elles activent la traduction IRES-dépendante au cours de la différenciation myoblastique, et ce, de façon promoteur-dépendante.

La seconde étape a été de développer, grâce à l'IRES du FGF1, un AAV (adeno-associated vector) exprimant deux facteurs angiogéniques ayant une activité synergique: FGF2 et Cyr61. Ce vecteur viral a été testé dans un modèle murin d'ischémie de la patte. Les résultats ont montré que l'AAV FGF2-Cyr61 présente un bénéfice thérapeutique important lorsqu'il est injecté à un animal ischémique, mais produit un effet délétère s'il est injecté plusieurs semaines avant la mise en place de l'ischémie.

La troisième étape qui est le cœur de cette thèse a été de développer une série de lentivecteurs mono-, bi- et tricistroniques exprimant différentes molécules pro-angiogéniques et cardio-protectrices : FGF2, Cyr61, apeline et SERCA2a. Ces vecteurs ont été injectés en phase aiguë de l'infarctus du myocarde chez la souris afin d'étudier leur potentiel thérapeutique sur l'insuffisance cardiaque chronique qui se développe après plusieurs semaines. Les résultats indiquent que le lentivecteur apeline-FGF2-SERCA2a engendre un bénéfice thérapeutique significativement supérieur à celui des autres lentivecteurs testés. En particulier, les analyses échocardiographiques et d'immuno-histochimie ont permis de mettre en évidence une amélioration de la fonction contractile, une augmentation de l'angiogenèse et une diminution du remodelage cardiaque. Cette combinaison présente donc un potentiel prometteur en vue d'un essai clinique. D'autre part, une autre combinaison produisant trois facteurs sécrétés, apeline, FGF2 et Cyr61, démontre une activité très significative sur la tubulogenèse de cellules endothéliales *in vitro* à partir de milieux conditionnés de cardiomyocytes transduits. Ce résultat a ouvert la perspective d'augmenter l'effet thérapeutique de cellules souches mésenchymateuses (CSM) lors de l'ischémie cardiaque, en modifiant génétiquement ces CSM à l'aide du lentivecteur angiogénique apeline-FGF2-Cyr61.

Summary

Despite of considerable advances in the pharmacological and surgical treatments of critical limb ischemia and ischemic heart failure, these pathologies remain an important problem of public health. Angiogenic gene therapy appears as an attractive approach to restore ischemic tissue perfusion whereas non-angiogenic gene transfer allows improvement of cardiac contractile function. However, gene therapy using only one therapeutic gene has delivered poor results in clinical studies; combined gene therapy appears then as a more promising strategy.

Gene therapy efficacy needs optimized gene transfer vectors, particularly in stress conditions where translation of the majority of cellular mRNAs is blocked. In response to stress, a small number of mRNAs is translated by an alternative mechanism involving IRESs (Internal Ribosome Entry Sites), structural elements of mRNAs that can be considered as translational enhancers. Moreover IRESs constitute biotechnological tools to design "multicistronic" cassettes, expressing combinations of therapeutic molecules.

The first step of my thesis has been to study the regulation of the FGF1 (Fibroblast Growth Factor 1) IRES identified in the lab for its strong activity in muscular cells. This feature makes it a choice tool for gene transfer in skeletal or cardiac muscle. This more fundamental part led us to identify two proteins associated to the FGF1 IRES and promoter: hnRNPM and p54^{nrb}. Knock-down or overexpression of these proteins showed that they activate IRES-dependent translation during myoblast differentiation, and in a promoter-dependent manner.

The second step has been to develop, using the FGF1 IRES, an AAV (adeno-associated vector) expressing two angiogenic factors showing a synergistic activity: FGF2 and Cyr61. This viral vector has been assessed in a murin model of hind limb ischemia. Results show that the AAV expressing FGF2 and Cyr61 generates an important therapeutic benefit when injected to an ischemic animal, but produces a deleterious effect when injected several weeks before the development of ischemia.

The third step, which is the heart of this thesis, was to develop a series of mono-, bi- and tricistronic lentivectors expressing different pro-angiogenic and cardio-protective molecules: FGF2, Cyr61, Apelin and Serca2a. Those vectors have been injected in acute phase of myocardium infarction in mice, in order to study their therapeutic potential on chronic heart failure developing after a few weeks. Results indicate that the Apelin-FGF2-Serca2a lentivector generates a therapeutic benefit significantly higher than the other tested lentivectors. In particular, echocardiography and immunohistochemistry analyses enabled us to highlight an improvement of contractile function, angiogenesis and a decrease of heart failure. This therapeutic combination presents a promising potential for clinical trial. Furthermore, another combination producing three secreted factors, Apelin, FGF2 and Cyr61, shows a significant stimulation of endothelial cell tubulogenesis *in vitro* from transduced cardiomyocytes conditioned medium. This result opens the perspective of enhancing the therapeutic effect of mesenchymal stem cells in heart ischemia, by genetically modifying those MSCs with the Apelin-FGF2-Cyr61 angiogenic lentivector.

Liste des abbréviations

AAV : adeno-associated virus	GENOA : genetic epidemiology network of arteriopathy
ABI : ankle brachial index	G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor
Ad : vecteur adénoviral	GM-CSF : granulocyte macrophage-colony stimulating factor
ADA : adénosine désaminase	GSK-3 : glycogen synthase kinase 3 β
Ang-1 ou Ang-2 : angiopoïétine 1 ou 2	HAS : haute autorité de santé
ANP : atrial natriuretic peptide	HEK : human embryonic kidney
AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs	HGF : hepatocyte growth factor
APAF1 : apoptotic protease activating factor	HIF : hypoxia inducible factor
BIA : biomolecular interaction analysis	HNF : hepatocyte nuclear factor 1-alpha
β -MHC : β -myosin heavy chain	hnRNP : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
BMP7 : one morphogenetic protein	HO-1 : heme oxygenase
BNP : brain natriuretic peptide ou B-type natriuretic peptide	HRE : hypoxia response element
CAT : chloramphenicol acetyltransferase	Hsp-20 : heat shock protein 20
CAR : coxsackievirus and adenovirus receptor	HSPG : heparan sulfate proteoglycans
CCN : <i>CYR61/CTGF/NOV</i>	HTLV1 : human T cell leukemia/lymphoma virus type 1
CCR1 : C-C Motif Chemokine Receptor 1	IC : insuffisance cardiaque
CH1 : GTP-cyclohydrolase 1	IGF-1 : insulin-like growth factor 1
CMV : cytomégalovirus	IL : interleukine
CPML : cellule progénitrice musculaire lisse	InVS : institut de veille sanitaire
CSF : colony-stimulating factor	IRES : internal ribosome entry site
CSH : cellule souche hématopoïétique	IRM : imagerie par résonance magnétique
CSM : cellule souche mésenchymateuse	ITAF : IRES trans-acting factor
CTGF : connective tissue growth factor	ITR : inverted terminal repeat
cTnl : troponine I cardiaque	LTR : long terminal repeat
Cyr61 : cysteine rich protein	MAPK : mitogen-activated protein kinase
Dll4 : delta-like ligand 4	MEF2C : myocyte enhancer factor 2C
ECG : électrocardiogramme	miRNA : microARN
ecSOD : extracellular superoxide dismutase	MLV : leucémie murine
EMCV : encephalomyocarditis virus	MMP : matrix métalloprotéinase
ERBB4 : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4	MS : mass spectrometry
ERK : extracellular signal-regulated kinases	NK : natural killer cells
FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche	NILV : non-integrative lentiviral vector
eNOS : endothelial nitric oxide synthase	NO : monoxyde d'azote
FGF : fibroblast Growth Factor	NOV : nephroblastoma overexpressed
FMDV : foot-and-mouth disease virus	NT-proBNP : N-terminal brain natriuretic peptide
FOX : forkhead box	NYHA : New York heart association
GATA4 : GATA Binding Protein 4	

ORF : open reading frame	TBX5 : T-box transcription factor 5
PAI-1 : plasminogen activator inhibitor 1	TGF : transforming growth factor
PDGF-BB : platelet-derived growth factor	TH : tyrosine hydroxylase
PKG1 α : protein kinase G1 α	TNF : tumor necrosis factor
PLGF : Placenta-like Growth Factor	TP : toe pressure
PS : Protamine sulfate	TSP-1 : thrombospondine 1
PTBP1 : polypyrimidine tract binding protein 1	uPA : urinary plasminogen activator
RCR : replication competent retroviruses	UTM : ultrasound-targeted micro-bubbles
ROS : reactive oxygen species	VEGF : vascular endothelial growth factor
RS : réticulum sarcoplasmique	VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor
RyR2 : récepteur cardiaque de la ryanodine	VIH : virus de l'immunodéficience humaine
SCF : stem cell factor ou c-Kit ligand	VSV : vesicular stomatitis virus
SDF1 : stroma-derived factor 1	XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein
SERCA : sarco(endo)plasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase	X-SCID : X-linked severe combined immunodeficiency
SGSH : N-sulfoglucosamine sulfohydrolase	WISP : WNT1 inducible signaling pathway protein 1
SIN : self-inactivating	WPRE : woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
siRNA : small-interfering RNA	
SkA : skeletal α -actin	
SUMF1 : sulfatase-modifying factor 1	
TAC : transverse aortic constriction	

Sommaire

Résumé	1
Summary	2
Liste des abbréviations.....	3
Introduction.....	11
I. Les pathologies ischémiques.....	13
I. 1) Définitions et origines de l'ischémie.....	13
I. 2) L'ischémie critique du membre inférieur	13
I. 2. a) Physiopathologie	14
I. 2. b) Dépistage et prise en charge.....	14
Dépistage	14
Facteurs de risque	15
Traitements médicaux et chirurgicaux	16
I. 3) L'insuffisance cardiaque ischémique	17
I. 3. a) Définition de l'insuffisance cardiaque	17
I. 3. b) Epidémiologie de l'insuffisance cardiaque.....	18
I. 3. c) Causes et facteurs de risque de l'insuffisance cardiaque.....	18
I. 3. d) Evolution clinique de l'insuffisance cardiaque.....	19
I. 3. e) Remodelage cardiaque.....	20
I. 3. f) Dépistage et prise en charge.....	21
Examens d'évaluation de l'IC	21
Traitements actuels	22
II. Modifications cellulaires et moléculaires au cours du remodelage cardiaque	25
II. 1) Les cardiomyocytes après infarctus.....	25
II. 1. a) Mort des cardiomyocytes.....	25
II. 1. b) Hypertrophie des cardiomyocytes	26
II. 1. c) Hyperplasie des cardiomyocytes	27

II. 1. d) Défauts dans le transport du calcium - Rôle de SERCA2a.....	27
II. 2) Inflammation dans le remodelage cardiaque.....	29
II. 3) Matrice extracellulaire et fibrose cardiaque	30
II. 4) Remodelage vasculaire	31
II. 5) Stress oxydatif.....	31
II. 6) Molécules cardioprotectrices - Rôle de l'apeline	33
III. La revascularisation post-ischémique	37
III. 1) Les mécanismes cellulaires du développement d'un réseau vasculaire fonctionnel	38
III. 1. a) La vasculogenèse.....	38
III. 1. b) L'angiogenèse.....	38
Vasodilatation et perméabilité endothéliale.....	39
Prolifération et migration des cellules endothéliales.....	40
Formation de la lumière	40
Survie endothéliale	40
Différenciation endothéliale et remodelage	41
III. 1. c) L'artériogenèse et stabilisation du réseau formé	41
III. 1. d) La croissance collatérale	41
III. 2) Les mécanismes d'induction et de stimulation de la revascularisation	42
III. 2. a) Le stimulus initial de la revascularisation : l'hypoxie	42
HIF activé par l'hypoxie	42
La famille des VEGF et leur rôle dans l'angiogenèse.....	43
L'apeline et ses effets vasculaires	44
FGF1, FGF2 et leur rôle dans l'angiogenèse	45
Cyr61 et ses effets sur la vascularisation.....	47
III. 2. b) Inflammation et revascularisation	50
Le rôle des monocytes.....	50
Le rôle des neutrophiles	50
Le rôle des lymphocytes	51
Le rôle des mastocytes	51

L'inflammation, la revascularisation et le remodelage du tissu.....	51
III. 2. c) Les cellules souches et progénitrices vasculaires.....	52
Mobilisation des cellules souches et progénitrices.....	52
Mécanismes d'action des cellules souches et progénitrices.....	52
Différents types de cellules souches adultes dérivées de la moelle	53
Autres cellules progénitrices impliquées dans la revascularisation.....	55
III. 2. d) Les forces hémodynamiques.....	55
III. 2. e) Les hormones	56
III. 3) Intérêts de l'angiogenèse thérapeutique	56
IV. Biothérapie des pathologies ischémiques	59
IV. 1) Thérapie basée sur les protéines recombinantes au stade clinique	59
IV. 2) Les vecteurs de thérapie génique.....	61
IV. 2. a) Les vecteurs non viraux.....	62
IV. 2. b) Les vecteurs viraux.....	63
Les vecteurs adénoviraux	64
Les vecteurs AAV (virus associés aux adénovirus)	66
Les vecteurs du virus Sendai.....	68
Les vecteur rétroviraux.....	69
Les lentivecteurs	71
Les lentivecteurs pour un transfert de gène dans le cœur et le muscle squelettique	73
IV. 3) Thérapie génique des pathologies ischémiques	75
IV. 3. a) Utilisation de SERCA2a en thérapie génique cardiaque	77
IV. 3. b) Utilisation d'apeline en thérapie génique	79
IV. 3. c) Utilisation de FGF2 en thérapie génique.....	80
IV. 3. d) Utilisation de Cyr61 en thérapie génique	81
IV. 3. e) Les limites des études cliniques de thérapie génique	82
IV. 4) Thérapie cellulaire	85
IV. 4. a) Thérapie cellulaire de l'ischémie des membres inférieurs	86
IV. 4. b) Thérapie cellulaire des pathologies ischémiques cardiaques	88

Thérapie cellulaire après infarctus aigu du myocarde	88
Thérapie cellulaire en insuffisance cardiaque ischémique	90
IV. 4. c) Les cellules souches mésenchymateuses pour une thérapie cellulaire.....	90
Les CSM dans l'ischémie critique du membre.....	90
Les CSM dans les cardiopathies ischémiques.....	91
Amélioration du potentiel des CSM dans le cœur	92
V. Thérapies géniques combinées.....	95
V. 1) Les IRES, activateurs traductionnels pour une expression combinée de transgènes	97
V. 1. a) La découverte des IRES	97
V. 1. b) La régulation des IRES	98
Régulation traductionnelle en conditions de stress.....	98
V. 1. c) L'IRES, un outil pour construire des vecteurs multicistroniques	100
V. 2) La tissu-spécificité des IRES cellulaires	101
V. 3) Applications biomédicales des IRES.....	102
V. 3. a) Applications précliniques	102
V. 3. b) Applications cliniques	105
V. 4) Des alternatives aux IRES pour des vecteurs multicistroniques	106
Objectifs	109
Résultats.....	111
Chapitre 1 Traduction promoteur-dépendante de l'IRES de FGF1 contrôlée par p54 ^{nrb} et hnRNPM au cours de la différenciation des myoblastes.....	113
Chapitre 2 Bénéfices thérapeutiques et effets indésirables d'une thérapie génique pro-angiogénique combinée de l'ischémie critique du membre.....	145
Chapitre 3 Bénéfices thérapeutiques et régulation transcriptomique par le transfert de gène combiné d'apeline, FGF2 et SERCA2a dans le cœur ischémique murin.....	165
Chapitre 4 Approche de thérapie génique combinée de l'ischémie cardiaque à l'aide de cellules souches mésenchymateuses co-exprimant le triplet apeline-FGF2-Cyr61	203
Discussion.....	219
Bibliographie	231
Annexes	269

Introduction

I. Les pathologies ischémiques

I. 1) Définitions et origines de l'ischémie

L'ischémie est une diminution ou une interruption de la circulation artérielle dans une région plus ou moins étendue d'un tissu ou d'un organe. Elle entraîne un déséquilibre entre les apports et les besoins en oxygène du tissu qui est alors dit hypoxique.

Elle survient suite à l'occlusion d'une artère par un caillot sanguin (thrombose), au rétrécissement important d'une paroi artérielle suite à un dépôt de plaques d'athérome (athérosclérose), à une hémorragie en amont ou à une compression du vaisseau.

Il existe plusieurs pathologies résultant d'un défaut en oxygène comme, entre autres, l'insuffisance rénale aiguë ischémique, les accidents vasculaires cérébraux ischémiques, l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI), ou encore l'insuffisance cardiaque ischémique. ***Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons particulièrement à l'ischémie critique du membre inférieur qui est une complication de l'AOMI et à l'insuffisance cardiaque ischémique.***

I. 2) L'ischémie critique du membre inférieur

La maladie artérielle périphérique se réfère à une manifestation locale de l'athérosclérose de l'aorte ou d'artères périphériques. Lorsqu'elle touche les membres inférieurs, on parle d'AOMI. Plus de 200 millions de personnes en sont atteintes dans le monde. La prévalence est de 3 à 10% de la population mais augmente jusqu'à 15-20% chez les personnes de plus de 70 ans. Plus de 50% des patients sont asymptomatiques. Pour les patients symptomatiques, cette pathologie se manifeste par une claudication intermittente, définie par une douleur dans la cuisse, la jambe ou le mollet à l'effort.

Cependant, sans suivi, la claudication intermittente peut progresser vers une douleur au repos, une ulcération et une nécrose. Il s'agit alors d'une ischémie critique du membre inférieur. Plus de 10% des patients ayant une maladie artérielle périphérique atteignent ce stade où plusieurs vaisseaux sont touchés par l'athérosclérose. Le taux de mortalité est alors de 10-20% chez les plus de 65 ans et augmente avec l'âge. En l'absence de revascularisation, on aboutit à la gangrène et plus de 40% des patients ne peuvent être traités que par amputation du membre, sans compter que le risque d'événements cardio- et cérébro-vasculaires augmente de 2 à 6 fois (Ai *et al.*, 2016; Foley *et al.*, 2016; Norgren *et al.*, 2007).

I. 2. a) Physiopathologie

Le développement des plaques d'athérome entraîne une réduction progressive de la lumière artérielle circulante. Parallèlement, la circulation collatérale de suppléance se développe et maintient le débit artériel d'aval. La collatéralité peut être suffisante pour éviter tout symptôme ischémique (Bacourt F, 2002). Cependant, après arrêt du flux artériel d'un membre, l'absence d'oxygénation des tissus entraîne rapidement une souffrance cellulaire avec un métabolisme en anaérobiose, réversible. Alors que les terminaisons nerveuses sensibles de la peau sont rapidement inactivées, avec paresthésies puis anesthésie, les terminaisons nerveuses sensibles des muscles restent fonctionnelles plusieurs heures, avec des douleurs profondes. Les muscles sont paralysés, leurs cellules produisent de l'acide lactique et relarguent des produits de lyse. Le débit du retour veineux du membre est très diminué, avec une faible diffusion de ces métabolites tant que le flux artériel n'est pas rétabli, et avec un risque de thrombose veineuse secondaire (Mills et Porter, 1991).

Au-delà de six heures d'ischémie, la viabilité des différents tissus est fortement compromise avec le développement de lésions de nécrose, irréversibles et plus ou moins étendues. En cas d'ischémie incomplète, la souffrance des tissus peut être modérée, et réversible plus longtemps. Ceci est le cas en particulier quand une circulation collatérale s'est développée auparavant et supplée plus ou moins bien à l'obstruction de l'axe artériel principal (Mills et Porter, 1991).

I. 2. b) Dépistage et prise en charge

Dépistage

L'AOMI peut être asymptomatique ou non. Pour les patients symptomatiques, deux sous-groupes se distinguent : la claudication intermittente et l'ischémie critique du membre inférieur. L'évolution et le pronostic n'étant pas les mêmes dans ces trois catégories, il est important de bien identifier le stade de cette maladie pour une meilleure prise en charge. La classification de Fontaine et Rutherford-Becker est la plus couramment utilisée (Tableau 1). Elle présente sur une échelle les différents symptômes, du stade asymptomatique à la perte du tissu en passant par différents niveaux de claudication (Dua et Lee, 2016). Il est à noter que même si cette classification porte à croire qu'il existe une chronologie entre ces différents stades, des patients peuvent avoir une ischémie critique sans avoir eu de symptômes au préalable.

Tableau 1 : Classification de Fontaine et Rutherford-Becker (adaptée de (Dua et Lee, 2016)).

Fontaine	Rutherford-Becker		Définition	Ankle-Brachial Index (ABI) / Toe Pressure (TP)
	Note	Catégorie		
Stade I	0	0	Asymptomatique	ABI > 0,95
Stade IIa	I	1	Claudication légère	ABI > 0,80
Stade IIb	I	2/3	Claudication modérée à sévère	ABI > 0,40
Stade III	II	4	Douleur au repos	ABI < 0,40
Stade IV	III	5/6	Perte du tissu (mineure 5 ; majeure 6)	TP < 30 mmHg

Le dépistage se fait par interrogatoire du patient, par un examen physique mais également par l'ABI (ankle brachial index). Cet index permet d'établir la présence et la sévérité de l'AOMI. Elle est obtenue en divisant la pression à la cheville par celle de l'artère brachiale. La pression à l'orteil (TP) inférieure à 50 mmHg permet également de mettre en évidence une AOMI sévère.

Facteurs de risque

Compte tenu de la sévérité potentielle de l'AOMI, il est important de réduire les complications athérosclérotiques en commençant prioritairement par la suppression des facteurs de risque.

Plusieurs facteurs de risque sont intrinsèques et ne peuvent donc être modifiés. Il s'agit tout d'abord de l'âge, abordé précédemment, puisque le risque de développer une maladie artérielle périphérique et particulièrement une ischémique critique, augmente de façon linéaire avec l'âge. L'homme est également plus sujet à développer une AOMI que la femme mais seulement avant 60 ans, puisque le risque associé au sexe n'est plus significatif au-delà. Il a également été démontré par l'étude GENOA (Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy) que l'origine ethnique jouait un rôle important, les Afro-américains développant plus souvent une AOMI (Dua et Lee, 2016).

Il existe cependant un certain nombre de facteurs de risque modifiables, les principaux étant le tabac, le diabète, l'hypertension et la dyslipidémie. Le tabagisme est le facteur de risque le plus important. Les fumeurs ont 4 fois plus de risques de claudication intermittente que les non-fumeurs. Ceux qui ont arrêté de fumer depuis plus de 5 ans voient ce chiffre diminuer à 3. De plus, la sévérité de la maladie tend à augmenter avec le nombre de cigarettes fumées (Norgren *et al.*, 2007). L'arrêt du tabac permet de ralentir la progression de l'ischémie

critique des membres inférieurs, et de réduire le risque d'amputation et d'infarctus du myocarde (Quick et Cotton, 1982).

Le diabète représente le deuxième facteur de risque le plus important de l'AOMI mais présente la plus forte corrélation avec la prévalence de l'ischémie critique. Les patients diabétiques ont 4 à 5 fois plus de risques de développer une ischémie critique, 10 fois plus de subir une amputation majeure et l'ischémie critique survient à un âge moins avancé (Becker et Loppinet, 2007). Ces risques sont tels que les recommandations actuelles sont de mesurer régulièrement l'ABI chez les patients diabétiques (Dua et Lee, 2016).

L'hypertension accroît le risque de développer une maladie artérielle périphérique et d'autant plus si le patient souffre de diabète. En ce qui concerne la dyslipidémie, le ratio du cholestérol total sur le HDL cholestérol serait le meilleur indicateur de développement de l'AOMI (Dua et Lee, 2016). Enfin, l'insuffisance rénale chronique est de plus en plus suspectée de favoriser l'apparition de l'AOMI, principalement chez la femme ménopausée (Norgren *et al.*, 2007).

L'association de plusieurs de ces facteurs accroît d'autant plus le risque, en particulier le tabac et le diabète (2 fois plus) ou encore l'hypertension et le diabète (Dua et Lee, 2016).

Traitements médicaux et chirurgicaux

Le tout premier traitement que les patients doivent suivre et quel que soit le niveau de l'AOMI se résume à modifier leur style de vie en supprimant les facteurs de risque tels que ceux cités précédemment. Il est cependant également recommandé d'adopter un régime alimentaire de type méditerranéen et de suivre un entraînement régulier par la marche (Foley *et al.*, 2016).

Dès l'apparition de symptômes de la claudication intermittente, des traitements pharmacologiques sont donnés aux patients pour réduire en priorité le risque cardiovasculaire tel que l'infarctus du myocarde, sachant que 70 à 80% des personnes atteintes d'AOMI meurent d'un événement cardiovasculaire majeur (Dua et Lee, 2016). Un agent antiplaquettaire, une statine et un inhibiteur de l'enzyme de conversion sont prescrits et permettent de réduire ces événements défavorables.

Au stade de l'ischémie critique, la première approche, de par l'urgence de la prise en charge, est la revascularisation pour améliorer la perfusion du membre puisque les thérapies médicamenteuses sont peu efficaces. Plusieurs techniques sont utilisées en chirurgie ouverte (endartériectomie, pontage) et en chirurgie endovasculaire (angioplastie). Le choix de la stratégie se fait suivant des considérations cliniques et anatomiques et il est possible

d'associer ces deux types de chirurgie. Par la suite, la thérapie antiplaquettaire est essentielle. La plupart des patients sont traités 1 à 3 mois avec du Clopidogrel et de l'aspirine sur le long-terme (Foley *et al.*, 2016).

L'évolution des techniques endovasculaires a permis de réduire la morbidité précédemment associée aux revascularisations en chirurgie ouverte (Foley *et al.*, 2016). Cependant, 30% des patients ne peuvent être candidats à une thérapie chirurgicale, certains répondent difficilement aux traitements et d'autres ont un taux de récurrence élevé (Ai *et al.*, 2016). Il faut savoir que, pour les patients atteints d'ischémie critique du membre, le taux d'amputation est de l'ordre de 25-30%, et que 25% meurent et 20% endurent une douleur non résolue ou une perte de tissu et ce, dans la première année (Sanada *et al.*, 2015). Dans un tel contexte d'impasse thérapeutique, d'autres approches se développent, telles que les thérapies géniques ou cellulaires, pour augmenter la revascularisation en stimulant le processus d'angiogenèse. ***Ces approches seront détaillées par la suite dans le chapitre IV.***

I. 3) L'insuffisance cardiaque ischémique

I. 3. a) Définition de l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) est une pathologie due à un dysfonctionnement du muscle cardiaque entraînant son incapacité à assurer son rôle de pompe. Le débit sanguin n'est plus suffisant pour satisfaire les besoins en oxygène nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme.

Il existe trois types d'insuffisance cardiaque : l'insuffisance cardiaque gauche, droite et globale. Dans le cas de l'insuffisance cardiaque gauche, le ventricule gauche ne travaille pas suffisamment, le sang s'accumule dans les poumons pouvant aboutir à la formation d'un œdème pulmonaire. Les tissus subissent en outre une mauvaise irrigation. Dans l'insuffisance cardiaque droite, l'atteinte du ventricule droit est responsable d'une accumulation de sang dans les tissus, ce qui mène à la formation d'œdème dans les jambes, la cavité abdominale ou d'autres régions. Lorsqu'il s'agit d'une insuffisance cardiaque globale, la fonction de la totalité du myocarde est très perturbée.

On distingue également l'IC chronique et l'IC aiguë. La première est la plus courante. Les symptômes apparaissent au fil du temps, lentement et ont tendance à s'aggraver. L'IC aiguë apparaît quant à elle de manière soudaine, et est d'emblée sévère. L'infarctus du myocarde peut en être la cause en entraînant des lésions sur une région du cœur, mais elle peut également survenir suite à une incapacité soudaine du corps à compenser une IC chronique.

L'infarctus, responsable de la cardiopathie ischémique, est la cause la plus fréquente de l'insuffisance cardiaque.

L'IC la plus rencontrée est associée à une dysfonction systolique du ventricule gauche. La fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) est définie par le rapport entre le volume de sang éjecté et le volume télédiastolique et correspond donc à l'efficacité de pompage du cœur. Elle est le plus souvent mesurée par échocardiographie. La FEVG est altérée dans le cas d'une dysfonction systolique (FEVG<45%). Il existe cependant une IC à fonction systolique préservée que l'on appelle également IC diastolique. Les symptômes sont similaires mais la fonction systolique est supérieure ou égale à 50%. On la retrouve plus fréquemment chez les patients âgés et les femmes. Elle semble être favorisée par l'hypertension artérielle et/ou une hypertrophie du ventricule gauche.

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'insuffisance cardiaque ischémique associée à une dysfonction systolique du ventricule gauche, causée par l'infarctus du myocarde.

I. 3. b) Epidémiologie de l'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque représenterait plus de 37,7 millions d'individus dans le monde. Aux Etats-Unis, 5,7 millions de personnes vivent avec une IC et 870 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année (Ziaeian et Fonarow, 2016). D'après l'Institut de veille sanitaire (InVS), 2,3% de la population adulte française souffre d'IC. En 2008, 360 000 patients ont été hospitalisés pour cardiopathies ischémiques ou IC et près de 60 000 en sont morts. Plus récemment, d'après une étude du Global Burden of Disease publiée en 2015, 17,3 millions de personnes sont décédées en 2013 des suites d'une maladie cardiovasculaire. D'après la Framingham Heart Study, la mortalité à 30 jours est de 10%, 20-30% à 1 an et augmente jusqu'à 45-60% à 5 ans (Bui *et al.*, 2011).

I. 3. c) Causes et facteurs de risque de l'insuffisance cardiaque

Un grand nombre de pathologies peut mener le patient à développer une insuffisance cardiaque. Parmi elles, l'hypertension artérielle est la deuxième cause d'IC derrière les cardiopathies ischémiques. Moins fréquemment, l'IC peut également être provoquée par des troubles du rythme cardiaque, une fibrillation auriculaire, une maladie des valves ou du muscle cardiaque, une maladie génétique ou familiale ou bien encore au cours ou à la suite d'une grossesse.

Néanmoins, la maladie cardiaque ischémique est considérée comme le facteur de risque le plus important de l'insuffisance cardiaque. Plus d'un tiers des patients développent une IC 7 à 8 ans après un infarctus du myocarde, et particulièrement les patients ayant une dysfonction du ventricule gauche au moment de leur crise cardiaque. L'ischémie a été identifiée comme la première cause d'hospitalisation dans 15% des patients avec IC, et génère un taux de mortalité plus important à l'hôpital, ou 60 et 90 jours après décharge (Bui *et al.*, 2011).

Etant donné la forte association entre les maladies artérielles et l'insuffisance cardiaque, les facteurs de risque de l'IC sont en grande partie les mêmes que ceux pour l'athérosclérose. On retrouve alors ceux cités précédemment dans le cas de l'ischémie critique des membres inférieurs.

La prévalence est inférieure à 2% pour les personnes âgées de moins de 60 ans mais augmente à 9,1% pour l'homme et 4,9% pour la femme entre 60 et 79 ans. Au-delà, l'écart se resserre avec une prévalence de 14,7% pour l'homme et de 12,8% pour la femme (Bui *et al.*, 2011). La ménopause en est certainement responsable puisque les œstrogènes qui ont un rôle cardioprotecteur deviennent moins abondants (Cong *et al.*, 2013). L'ethnicité a également un impact sur la survenue de l'IC. Dans la population américaine, l'incidence est plus importante chez les individus afro-américains, s'ensuivent les personnes d'origine caucasienne et d'origine hispanique, puis celles d'origine chinoise.

Le diabète et l'obésité sont des facteurs de risque majeurs. Le risque est par exemple multiplié par 2 chez l'homme diabétique et par 4 chez la femme diabétique. Le taux de survie à 5 ans d'un patient avec IC passe de 46% à 37% lorsqu'il est atteint de diabète (Bui *et al.*, 2011). Le tabac est sans surprise associé à l'IC avec un risque augmenté de 47% chez les fumeurs. Les anciens fumeurs ont un taux de mortalité de 30% plus faible et ceci continue de s'améliorer après 2 ans d'arrêt du tabac.

Parmi les facteurs de risque mineurs, on y retrouve la dyslipidémie, l'insuffisance rénale, et des facteurs environnementaux tels que le stress psychologique, le statut socio-économique, la consommation excessive d'alcool ou encore la sédentarité (Bui *et al.*, 2011).

I. 3. d) Evolution clinique de l'insuffisance cardiaque

Il existe quatre stades d'IC, selon la sévérité des symptômes, détaillés dans la classification clinique de la New York Heart Association (NYHA):

- Classe 1 : aucun symptôme.
- Classe 2 : symptômes à l'effort sans limitation des activités habituelles.
- Classe 3 : symptômes à l'effort limitant les activités habituelles.
- Classe 4 : symptômes au repos.

Il existe également une classification anatomique, basée sur l'évolution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG). Les classifications clinique et anatomique ne sont pas nécessairement corrélées.

Les signes classiques d'insuffisance cardiaque sont l'asthénie (fatigue), la dyspnée d'effort, la toux, la tachycardie, le bruit de galop à l'auscultation, les bruits crépitants et l'œdème pulmonaire, l'œdème des membres inférieurs, la pression artérielle pincée (Pouchain, 2003).

L'IC commence par une phase d'adaptation à la lésion cardiaque post-infarctus. Elle permet de maintenir une pression artérielle suffisante en passant par une augmentation du tonus sympathique. On observe une augmentation de la fréquence cardiaque qui permet d'assurer le débit et une meilleure contractilité. Ces adaptations ne sont cependant pas bénéfiques sur le long terme puisqu'elles affectent la réserve myocardique. Le remodelage cardiaque adaptatif est délétère avec une dilatation et une hypertrophie cardiaques pouvant conduire à une phase de décompensation. La contraction du ventricule est alors de moins en moins efficace, d'abord à l'effort puis même au repos. Le débit cardiaque n'est maintenu qu'au prix d'une dépense énergétique et d'une fatigue myocardique croissantes qui renforce les lésions tissulaires (défaut d'oxygénation, fibrose myocardique) et aggrave donc l'IC. La dyspnée et la fatigue sont les principaux signes de décompensation. Ils apparaissent à l'effort puis au repos. Une toux sèche, une altération de l'état de santé général et des troubles cognitifs peuvent également se manifester dans le cas d'une décompensation.

I. 3. e) Remodelage cardiaque

En réponse à un certain nombre de signaux mécaniques, biochimiques et moléculaires, le cœur change de taille et de forme. On parle alors de remodelage cardiaque. L'ampleur de celui-ci dépend de l'étendue des dommages et de leurs localisations.

Après interruption de la perfusion artérielle consécutive à une occlusion d'un vaisseau lors de l'infarctus du myocarde, le remodelage débute directement par la mort des cardiomyocytes dans la zone non irriguée. Ils libèrent alors des protéines intracellulaires ce qui déclenche une réponse inflammatoire se traduisant par la mobilisation des macrophages permettant d'éliminer les débris cellulaires. Par la suite, les fibroblastes cardiaques prolifèrent et sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène I

pour former une cicatrice fibreuse qui remplace les cellules musculaires mortes. Cette cicatrice est particulièrement résistante et empêche alors la rupture de la paroi.

Ce processus de remodelage du ventricule gauche se poursuit progressivement en réponse à l'augmentation du stress que subit la paroi, provoquant l'hypertrophie des cardiomyocytes dans la zone frontière, l'altération de la structure du cytosquelette, l'amincissement et la rigidité de la paroi, et la dilatation de la chambre du ventricule gauche. Cette combinaison est responsable d'une croissance anormale du cœur qui se traduit par l'augmentation des volumes télédiastoliques et télésystoliques et la diminution de la fraction d'éjection (Burchfield *et al.*, 2013).

Les mécanismes rencontrés au cours du remodelage cardiaque seront détaillés par la suite.

I. 3. f) Dépistage et prise en charge

Examens d'évaluation de l'IC

En plus des examens cliniques permettant la détection des signes classiques d'IC cités précédemment (dyspnée, toux...), plusieurs techniques sont utilisées pour renforcer le diagnostic et déterminer le stade de l'IC afin d'adapter la prise en charge.

Le médecin peut tout d'abord rechercher une éventuelle tachycardie et des signes d'hypertrophie ventriculaire gauche à l'aide d'un électrocardiogramme (ECG). L'œdème pulmonaire et la dilatation cardiaque peuvent être détectés par radiographie du thorax. Des examens biologiques sont également effectués pour détecter la présence de marqueurs d'insuffisance cardiaque tels que la troponine, le BNP et le NT-proBNP (brain natriuretic peptide et son précurseur) ou pour rechercher des anomalies comme une insuffisance rénale ou une anémie.

Afin d'évaluer la structure et la fonction cardiaque, le patient peut subir une échocardiographie. Celle-ci permet de calculer la fraction d'éjection, mais aussi de visualiser une potentielle hypertension artérielle pulmonaire, ou les différents débits cardiaques. Lorsque l'échocardiographie est difficilement réalisable, il est possible d'effectuer un IRM cardiaque qui permet également de déterminer la fraction d'éjection ou les volumes ventriculaires. Elle permet aussi d'observer d'éventuelles anomalies ou remodelages cardiaques comme la fibrose ou de diagnostiquer un œdème cardiaque.

En cas de suspicion de cardiopathie ischémique, une coronarographie peut être effectuée pour étudier le réseau coronaire. Enfin, l'évaluation à l'effort présente une valeur

diagnostique limitée. Cependant, une faible distance parcourue au cours du test de marche de 6 minutes est associée à un mauvais pronostic.

Traitements actuels

Au même titre que l'ischémie critique des membres inférieurs, le premier traitement non médicamenteux que les patients doivent suivre et quel que soit le niveau d'IC, est la modification du style de vie pour supprimer les facteurs de risque cités précédemment (tabac, alcool...). Des règles d'hygiène diététique doivent être adoptées (régime hyposodé, exercice physique adapté).

Des traitements pharmacologiques sont recommandés en cas d'IC. Chez tous les patients dont la fraction d'éjection est inférieure à 40%, le traitement standard comprend un inhibiteur d'enzyme de conversion et un bêtabloquant. Pour ceux qui répondent à ce premier traitement, il est possible de prescrire des antagonistes des récepteurs de l'aldostérone et/ou des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II. En cas de dysfonction ventriculaire gauche sévère, un anticoagulant oral peut être proposé.

Cependant, le traitement par dispositifs intracardiaques (stimulation biventriculaire) prend une place croissante dans l'IC demeurant symptomatique malgré un traitement optimal. En cas de résultat insuffisant, une indication d'assistance ventriculaire gauche ou de greffe cardiaque est discutée. Une resynchronisation biventriculaire, à l'aide d'une sonde de stimulation, permet d'améliorer la morbidité et la mortalité. Dans certains cas, on peut proposer un défibrillateur implantable associé à la resynchronisation ventriculaire. Dans le cas de l'IC ischémique, une revascularisation myocardique est envisagée pour restaurer le flux sanguin grâce à la pose d'un stent dans l'artère coronaire affectée. Lorsque le patient ne répond pas aux traitements, et que l'IC devient sévère, la transplantation cardiaque ou un dispositif d'assistance ventriculaire gauche sont préconisés (HAS, 2014).

Il est cependant important de noter que les interventions chirurgicales ne sont pas toujours envisageables en raison de l'état de santé du patient, de la dégradation de la fonction ventriculaire gauche, de critères anatomiques (conformation de la sténose, présence de sténoses étagées, présences de thromboses) ou bien encore en raison du délai d'attente pour bénéficier d'une greffe cardiaque (Couffignal *et al.*, 2001).

Malgré les avancées considérables dans les thérapies pharmacologiques et chirurgicales, la prise en charge de certains patients est limitée et le pronostic reste faible. Un grand nombre de molécules sont la cible de recherches fondamentales et cliniques pour diminuer le remodelage cardiaque, la fibrose, ou améliorer l'angiogenèse.

II. Modifications cellulaires et moléculaires au cours du remodelage cardiaque

II. 1) Les cardiomyocytes après infarctus

De par leur capacité à se contracter, les cardiomyocytes assurent la fonction contractile du cœur. Par conséquent, des changements qualitatifs et quantitatifs altèrent leur bon fonctionnement, et contribuent alors à l'évolution de l'IC.

II. 1. a) Mort des cardiomyocytes

Après un infarctus du myocarde, les cellules entrent dans un processus de nécrose (ou de lyse) et libèrent alors leur contenu intracellulaire. Parmi les protéines relarguées, certaines peuvent être dosées dans le sang et sont utilisées comme des marqueurs de dysfonction cardiaque (Burchfield *et al.*, 2013) : la troponine I cardiaque (cTnI) connue pour augmenter après un infarctus du myocarde (J. E. Adams, 3rd *et al.*, 1993), la troponine T ou encore la créatine kinase MB moins spécifiques.

Les cardiomyocytes peuvent également entrer en apoptose (ou mort cellulaire programmée) mais contrairement à la nécrose, ce processus ne génère pas de réponses inflammatoires et peut être réversible jusqu'à un point de non-retour. Pendant longtemps, l'apoptose a été considérée comme une mort cellulaire programmée alors que la nécrose était plutôt un processus non régulé et incontrôlable. Cependant, certaines études suggèrent que la nécrose et l'apoptose sont deux faces d'un même processus appelé *nécroptose* jouant un rôle dans la pathogenèse ischémique (Vandenabeele *et al.*, 2010). Enfin, les cellules mourantes manifestent des preuves d'implication d'un processus d'autophagie qui permet le recyclage du contenu intracellulaire, suite à la dégradation partielle du cytoplasme par leurs propres lysosomes. Cependant, des débats subsistent encore quant à savoir si la cascade autophagique reflète une réponse cellulaire au stress servant à promouvoir la survie cellulaire ou si elle contribue elle-même à la mort cellulaire (Burchfield *et al.*, 2013).

Néanmoins, des inhibiteurs sélectifs ciblant l'apoptose (inhibiteurs des caspases), la nécrose (inhibiteurs de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale) ou la nécroptose (nécrostatine 1) ont été utilisés dans le cœur (Burchfield *et al.*, 2013). La suppression de l'apoptose diminue le remodelage défavorable et la progression de l'IC dans des modèles d'ischémie-reperfusion, d'IC induit par un infarctus et de cardiomyopathies non-ischémiques (Chandrasekhar *et al.*, 2004; Hayakawa *et al.*, 2003; Wencker *et al.*, 2003).

Cependant, le moment optimal pour la thérapie, les cibles pour l'inhibition de la cascade de protéines apoptotiques, le mécanisme précis d'inhibition, et même le type de cellules impliquées restent partiellement ou totalement inconnus. Certains traitements déjà sur le marché pourraient supprimer la mort cellulaire, comme des bloqueurs de l'angiotensine II ou de la norépinéphrine. Ces deux hormones sont en effet connues pour déclencher l'apoptose des cardiomyocytes (Kajstura *et al.*, 1997; Sabbah *et al.*, 2000).

Cyr61 (cysteine rich protein 61) ou CCN1, une protéine de la matrice extracellulaire, qui joue un rôle dans l'angiogenèse (**décrit dans le chapitre III**) et la survie des cellules, protège les cardiomyocytes de la nécrose et de l'apoptose en condition de stress oxydatif en se liant à ces cellules via l'intégrine $\beta 1$ (Yoshida *et al.*, 2007). Il pourrait alors être bénéfique dans le traitement de l'IC.

De même, il a été montré que le FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), un candidat notamment très utilisé dans les cardiomyopathies ischémiques pour son pouvoir pro-angiogénique, protège le cœur après infarctus en présence mais également en absence de reperfusion (Jiang *et al.*, 2004). En effet, il améliore la survie des cardiomyocytes et la fonction cardiaque dans différents modèles (Kardami *et al.*, 1991; F. Sheikh *et al.*, 2001). **Les rôles de FGF2 dans la revascularisation seront détaillés par la suite.**

II. 1. b) Hypertrophie des cardiomyocytes

En réponse au stress biomécanique, le nombre de myocytes diminuant, les myocytes survivants deviennent plus allongés ou hypertrophiés pour permettre de compenser la perte du tissu contractile. Un grand nombre d'événements transcriptionnels et post-transcriptionnels ont lieu, tels que l'activation d'un ensemble de gènes exprimés au cours du développement fœtal. On distingue parmi eux l'ANP et le BNP (atrial/brain natriuretic peptide), la β -MHC (β -myosin heavy chain) ou la SkA (skeletal α -actin), utilisés couramment comme marqueurs de l'hypertrophie. Les cardiomyocytes répondent également aux cytokines, aux facteurs de croissance ou encore à certaines hormones (Barry *et al.*, 2008; Burchfield *et al.*, 2013).

Bien qu'aucun agent thérapeutique ne cible directement la croissance hypertrophique, quelques stratégies permettraient d'altérer cette réponse de façon secondaire comme influencer sur la suppression de neurohormones (catécholamines, aldostérone, ou encore l'angiotensine II), sur le calcium (avec SERCA2a par exemple, *décrit ci-dessous*) ou la précharge (vasodilatateurs ou diurétiques) (Burchfield *et al.*, 2013).

II. 1. c) Hyperplasie des cardiomyocytes

Bien que des études récentes aient révélé que les cellules cardiaques se régénèrent chez l'adulte, leur fréquence de régénération et leur provenance ne sont pas bien connues. Bergman et coll. ont pu mettre en évidence que 50% des cardiomyocytes sont échangés au cours d'une vie (Bergmann *et al.*, 2009). Ce renouvellement serait attribué à la division des myocytes existants, aux progéniteurs résidents et/ou à des niches exogènes telles que la moelle osseuse. Senyo et coll. ont prouvé que l'infarctus du myocarde stimule la division des cardiomyocytes préexistants (Senyo *et al.*, 2013). Cette hyperplasie peut remplacer les cardiomyocytes mourants mais dans de faibles proportions (Burchfield *et al.*, 2013).

Il a aussi été démontré que les cellules progénitrices cardiaques localisées au niveau de l'épicaarde migrent vers le myocarde où elles subissent une transition épithélio-mésenchymateuse pour devenir des myofibroblastes, des fibroblastes et des cellules musculaires lisses (Zhou et Pu, 2011). Ces progéniteurs n'auraient qu'un rôle limité après une lésion (Senyo *et al.*, 2013) mais l'administration de ces cellules a montré un fort potentiel sur la fonction cardiaque de rat en IC (Tang *et al.*, 2010).

Parmi les facteurs permettant de stimuler le renouvellement des cellules cardiaques mortes après un infarctus, Rosenblatt-Velin et coll. ont identifié le FGF2 (Rosenblatt-Velin *et al.*, 2005). Il permet en effet d'accélérer la mobilisation et la différenciation de précurseurs cardiaques en cardiomyocytes fonctionnels.

II. 1. d) Défauts dans le transport du calcium - Rôle de SERCA2a

Des altérations dans la relaxation myocardique ont été rapportées au cours de l'insuffisance cardiaque. Cette relaxation est gouvernée par de multiples facteurs parmi lesquels les défauts dans le transport du calcium dans les cardiomyocytes, qui jouent un rôle central dans ces altérations. Il a été montré chez l'homme, que les contractions étaient prolongées dans les cœurs en insuffisance, et que des échanges anormaux en Ca^{2+} entre le cytosol et le réticulum sarcoplasmique sont responsables d'une dysfonction systolique et diastolique (Gwathmey *et al.*, 1987).

Dans un cœur normal, la dépolarisation de la membrane cause un flux de calcium dans le cytoplasme. L'augmentation en Ca^{2+} dans le cytosol induit la libération des ions Ca^{2+} provenant du réticulum sarcoplasmique (RS) à travers RyR2 (récepteur cardiaque de la ryanodine), ce qui déclenche la liaison du Ca^{2+} à la troponine C. Cette interaction permet la contraction du muscle cardiaque. A l'inverse, l'entrée du Ca^{2+} dans le RS induit la relaxation du muscle. Plusieurs pompes permettent le retrait du Ca^{2+} cytosolique mais le mécanisme le

plus efficace qui permet le contrôle optimal de l'homéostasie du Ca^{2+} est le re-stockage du Ca^{2+} dans le RS par SERCA (Sarco(Endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) (Gwathmey *et al.*, 1987; Shareef *et al.*, 2014) (Figure 1).

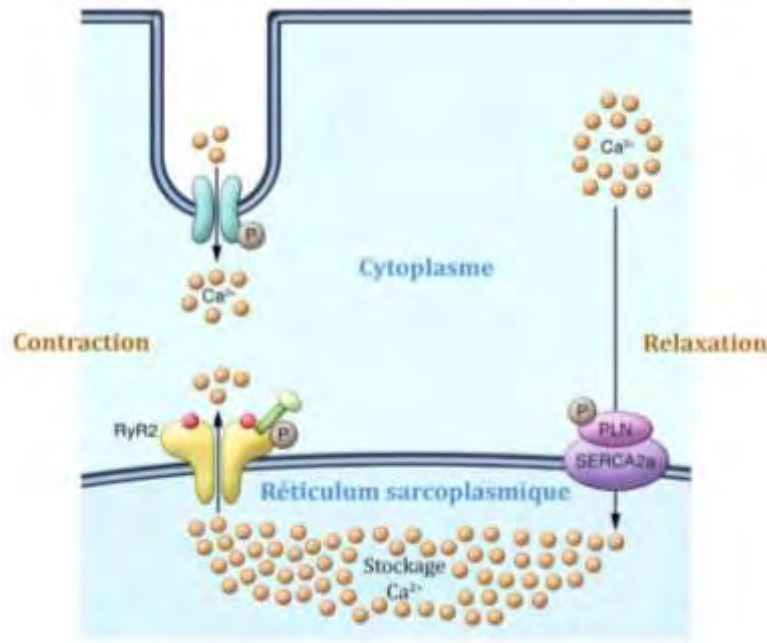


Figure 1 : Cycle du transport du calcium dans les cardiomyocytes

PLN : phospholambane ; RyR2 : récepteur cardiaque de la ryanodine ; Ca^{2+} : calcium. Adapté de (Marks, 2013)

Les protéines SERCA sont exprimées à partir de trois gènes hautement conservés mais localisés sur des chromosomes différents : SERCA1, 2 et 3. SERCA2 est la protéine la plus courante et peut se retrouver sous la forme 2a, 2b ou 2c. La première est détectée dans les muscles squelettiques à contraction lente et les cardiomyocytes, SERCA2b dans différents tissus, et SERCA2c dans les cellules épithéliales et endothéliales et les cardiomyocytes. SERCA2a est traduit à partir du premier transcrit du gène ATP2A2 et est le plus exprimé dans les cardiomyocytes (Shareef *et al.*, 2014). L'affinité de cette protéine pour le Ca^{2+} est contrôlée par le phospholambane, un inhibiteur endogène.

Il a été montré que la suppression du gène SERCA2 de façon homozygote mène à la mort prématurée des souris alors que les animaux hétérozygotes présentent une diminution du niveau protéique de SERCA2 de 65%. Ceci induit une réduction de la pression artérielle, de la pression ventriculaire systolique, et de la contractilité (Periasamy *et al.*, 1999). De plus, Mercadier et coll. ont démontré que les défauts dans le transport du Ca^{2+} observés dans les myocardiocytes de patients atteints d'IC sont associés à une expression et une activité réduites de SERCA2 (Mercadier *et al.*, 1990). D'autres études ont également permis de mettre en évidence une diminution de la fonction de SERCA2 dans plusieurs maladies cardiaques telles

que les cardiomyopathies dilatées, hypertrophiques ou ischémiques (de Tombe, 1998; Shareef *et al.*, 2014).

Bien que l'altération de l'expression de SERCA2a ne soit pas la cause initiale de l'IC, elle contribue clairement à la détérioration de la fonction cardiaque après infarctus. Plusieurs médicaments ont été testés dans différents modèles animaux et ont montré des effets sur l'expression et la fonction de SERCA2. Certains permettent la restauration de la fonction contractile au cours de l'IC. On y retrouve par exemple des inhibiteurs d'enzyme de conversion ou des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II. Cependant, l'utilisation de ces molécules reste controversée principalement à cause de leurs effets pléiotropiques (Shareef *et al.*, 2014).

Une attention particulière a été apportée à la thérapie génique qui permet de cibler précisément le gène qui fait défaut. Des études ont été réalisées pour déterminer si la restauration des niveaux de la protéine SERCA2a permettait d'améliorer la fonction contractile. ***Les résultats de cette thérapie génique seront discutés par la suite.***

II. 2) Inflammation dans le remodelage cardiaque

Le système immunitaire joue un rôle important dans le remodelage, et son activation persistante peut mener à des dommages cardiaques à long terme.

Après un infarctus du myocarde, une cascade de signaux mène au recrutement de cellules inflammatoires dans le territoire infarcté dirigé par des cytokines et des chimiokines, ce qui se traduit par la mise en route d'un processus de réparation du tissu caractérisé par l'activation de fibroblastes et la formation d'une cicatrice. La réponse inflammatoire initiale est dominée par l'accumulation de neutrophiles, suivie par l'infiltration de phagocytes mononucléaires (monocytes, macrophages et cellules dendritiques), trois jours après l'infarctus. Les lymphocytes B s'accumulent également dans la zone infarctée jusqu'à atteindre un nombre maximal à cinq jours post-infarctus. Ils stimulent la mobilisation de monocytes et contribuent aux dommages tissulaires (Zouggari *et al.*, 2013). Après une semaine, la majorité des macrophages sont anti-inflammatoires et participent à la résolution de l'inflammation, à l'angiogenèse, à la prolifération des myofibroblastes et enfin à la formation d'une cicatrice mature (Dick et Epelman, 2016). L'insuffisance cardiaque à un stade avancé est caractérisée par une accumulation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les cellules T CD4⁺ en particulier aggravent le remodelage tissulaire, en favorisant la fibrose et la transition de l'hypertrophie vers l'insuffisance cardiaque (Laroumanie *et al.*, 2014).

Peu d'études ont examiné le rôle des cellules immunitaires au cours de l'insuffisance cardiaque chronique ischémique. Des biomarqueurs inflammatoires élevés ont été détectés chez des patients atteints d'IC, mais on ne sait pas encore clairement si l'inflammation est responsable de sa progression. Parmi les biomarqueurs, on trouve une augmentation du nombre de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (tumor necrosis factor α), les interleukines IL-1 et IL-6 ou la galectine-3, ce qui mène à penser que l'inflammation peut contribuer à l'IC (Dick et Epelman, 2016). Il a été observé que les cytokines sécrétées dans le myocarde ont le potentiel de produire une décompensation cardiaque lorsqu'elles atteignent de fortes concentrations (Diwan *et al.*, 2003). Chez le rat, Adams et coll. montrent que l'IC ischémique mène à une augmentation de TNF- α qui agit indirectement sur la dégradation protéique (R. H. Adams et Alitalo, 2007). Les auteurs suggèrent que la production chronique de ce facteur engendrerait la dégradation de la troponine I, et diminuerait donc la contractilité cardiaque.

Les traitements ayant pour but de limiter l'inflammation ont été controversés, principalement à cause du manque de connaissance sur le remodelage cardiaque induit par ces cytokines. On ne sait pas si l'inflammation est une cause ou une conséquence de la progression de cette pathologie (Dick et Epelman, 2016). Dans des modèles d'IC, le blocage du TNF- α a permis l'amélioration de la fonction cardiaque. De larges essais cliniques ont été mis en place pour évaluer l'effet de ce blocage, mais ont dû être arrêtés du fait d'un manque de bénéfice clinique et parce que la forte dose avait un effet néfaste sur le cœur (Dick et Epelman, 2016).

II. 3) Matrice extracellulaire et fibrose cardiaque

La taille, la forme et l'épaisseur de la matrice extracellulaire sont des déterminants importants de l'architecture du ventricule. Le dépôt excessif de cette matrice est une des caractéristiques du remodelage cardiaque. Après un infarctus du myocarde, la fibrose remplace les régions où les cardiomyocytes sont morts mais elle peut également être interstitielle, menant alors à la diminution de la compliance ce qui réduit la capacité à diffuser l'oxygène. Ces altérations sont responsables de dysfonctionnements contractiles, de troubles du rythme et donc d'une importante morbidité et mortalité (Assomull *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2006).

Au niveau moléculaire et cellulaire, la nécrose des cardiomyocytes après infarctus accroît la sécrétion de facteurs de croissance dans le tissu conjonctif, ce qui résulte en la formation de nouveaux fibroblastes responsables du dépôt de matrice extracellulaire et de la formation

de la fibrose. Ces fibroblastes prolifèrent et se différencient en myofibroblastes, acquérant alors la capacité de se contracter et de sécréter le collagène I et III et la fibronectine. Des changements dans la dégradation de la matrice extracellulaire sont associés à un déséquilibre entre les métalloprotéinases (MMP pour matrix metalloproteinase) et les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases qui cause alors une fibrose excessive. Les MMPs sont utilisés comme marqueurs de la fibrose au même titre que la galectine-3 (Braunwald, 2013; Burchfield *et al.*, 2013; Gandhi *et al.*, 2015; Moore-Morris *et al.*, 2015).

La quantité de cicatrice fibreuse dans le cœur est fortement corrélée avec les arythmies et la mortalité post-infarctus. Des thérapies ciblant la fibrose pourraient être alors bénéfiques pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Une étude a mis en évidence l'action anti-fibrotique du Losartan. Cet antagoniste au récepteur de l'angiotensine II permet de réduire la fibrose et la rigidité de la paroi chez des patients atteints d'hypertension cardiaque (Diez *et al.*, 2002). Chez le rat et le lapin, le traitement avec des statines diminue la synthèse de collagène, la fibrose, l'hypertrophie et améliore la fonction cardiaque (Bauersachs *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2001).

II. 4) Remodelage vasculaire

Le système vasculaire est altéré dans l'IC. A l'athérosclérose responsable de l'infarctus du myocarde, s'ajoute un remodelage vasculaire lié entre autres à un changement dans la structure du muscle cardiaque, à l'état métabolique et à la fibrose. Un processus d'angiogenèse se met en place rapidement après l'infarctus du myocarde. Il permet de développer un réseau collatéral au niveau des branches des artères coronaires dans le but de limiter les dommages liés au manque de perfusion post-infarctus. L'hypoxie, l'inflammation, les cellules souches et progénitrices ainsi que les forces hémodynamiques et les hormones sont responsables de l'initiation et du développement de l'angiogenèse. ***Les mécanismes de formation d'un réseau collatéral fonctionnel font l'objet d'une troisième partie.***

II. 5) Stress oxydatif

Le stress oxydatif, défini comme une production excessive des espèces oxygénées réactives (ROS), joue un rôle important dans le développement et le pronostic de l'IC (J. J. Belch *et al.*, 1991). L'endothélium vasculaire représente une surface particulièrement vulnérable aux radicaux libres dû à l'interaction avec le monoxyde d'azote (NO). En effet, l'endothélium permet la formation et le relargage de NO. Les ROS, tels que le superoxide $O_2^{\cdot-}$, se lient au

NO réduisant alors la quantité de NO disponible utilisé pour la relaxation des cellules musculaires lisses. Ceci engendre une vasodilatation NO-dépendante. L'inflammation puis le stress oxydatif élevé sont responsables de la réduction en NO disponible et du développement de la dysfonction endothéliale, un phénotype délétère associé à un mauvais pronostic chez les patients en IC (Wray *et al.*, 2016).

En plus de ces effets directs, les ROS peuvent également induire une réponse indirecte en modifiant l'expression de gènes sensibles au statut redox de la cellule. Ces modifications seraient à l'origine de l'induction de l'apoptose des cardiomyocytes ou encore de l'hypertrophie cardiaque.

En parallèle de cette augmentation de la production de molécules oxydantes, une diminution des défenses anti-oxydantes est également observée au cours de l'IC. En effet, les réserves anti-oxydantes, constituées d'enzymes d'une part, telles que la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, et d'anti-oxydants non enzymatiques d'autre part comme les vitamines C, E et A ou le glutathion, sont connues pour être diminuées (Monteil *et al.*, 2004).

Une approche pour améliorer le stress oxydatif est la supplémentation d'anti-oxydants. Chez le rat en IC, l'administration de substances qui piègent les radicaux libres (probuticol, diméthylthiourée, régime riche en vitamine E) améliore de façon significative la fonction systolique et/ou diastolique cardiaque, diminue la dilatation du ventricule gauche, ainsi que la fibrose et l'hypertrophie (Kinugawa *et al.*, 2000; Palace *et al.*, 1999; Sia *et al.*, 2002). Cependant, de larges études cliniques n'ont pas permis de mettre en évidence un effet bénéfique à long terme de la consommation d'anti-oxydants sur la morbidité et la mortalité de l'IC (Heart Protection Study Collaborative, 2002; Kris-Etherton *et al.*, 2004). Cette absence de bénéfice pourrait être liée au fait que ces essais n'ont utilisé qu'une mono-supplémentation en vitamines anti-oxydantes, alors que ces molécules agissent surtout de façon synergique avec d'autres anti-oxydants. De plus, des thérapies avec les inhibiteurs de conversion de l'angiotensine II, les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II, ou certains bêtabloquants, induisent une diminution du stress oxydant dans des modèles animaux d'IC ou chez l'homme. Cependant, étant donné la diversité des actions de ces molécules (apoptose, hypertrophie des cardiomyocytes, transport du calcium, fibrose), il est difficile de savoir si l'effet bénéfique observé est directement lié à la diminution du stress oxydant (Monteil *et al.*, 2004).

II. 6) Molécules cardioprotectrices - Rôle de l'apeline

En 1993, APJ, récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G, a été découvert par O'Dowd et coll. (O'Dowd *et al.*, 1993). Il partage 31% d'identité de séquence protéique avec le récepteur de type 1 des angiotensines (AT1) mais ne fixe cependant pas spécifiquement l'angiotensine II. En 1998, le peptide apeline est isolé d'extraits d'estomac de bœuf et identifié comme ligand endogène du récepteur APJ (Tatemoto *et al.*, 1998). Il est synthétisé sous forme d'un prépropeptide de 77 résidus d'acides aminés clivé en isoformes de 36, 19, 17, 16 ou 13 résidus (He *et al.*, 2015). L'apeline-13 détient la plus forte affinité avec le récepteur APJ et c'est aussi l'isopeptide prédominant dans le cœur humain et le plasma (Dalzell *et al.*, 2015). Des études ont montré que le système apeline/APJ se retrouve également dans d'autres tissus tels que le tissu adipeux, les tumeurs, les poumons et le cerveau (G. Barnes *et al.*, 2010; He *et al.*, 2015). Son rôle est bien documenté dans le système cardiovasculaire. L'apeline est exprimée entre autres dans les cellules endothéliales vasculaires de l'endocarde, dans les artères coronaires épocardiques et dans les petites artères coronaires intramyocardiques. Bien qu'APJ soit présent dans les cellules endothéliales vasculaires et dans les cellules musculaires lisses vasculaires, l'endothélium semble être la source prédominante de la synthèse d'apeline dans le système vasculaire (Dalzell *et al.*, 2015).

Les niveaux d'apeline immunoréactive sont 200 fois plus élevés dans l'atrium que dans le ventricule gauche chez l'homme, suggérant que l'apeline est produite principalement dans l'atrium (Foldes *et al.*, 2003). Cependant les peptides retrouvés dans cette partie du cœur sont essentiellement de poids moléculaires supérieurs à celui de l'apeline-36. Les niveaux de cette protéine dans l'atrium diminuent en IC alors que ceux de l'ARNm sont similaires. L'ARNm de l'apeline et l'apeline immunoréactive dans le ventricule gauche sont, quant à eux, augmentés dans des patients en IC. Le niveau plasmatique des peptides semble corrélér à ceux de l'atrium, suggérant que celui-ci est la source de l'apeline plasmatique mais ceci reste à confirmer. En ce qui concerne le récepteur APJ, son niveau reste stable dans le ventricule gauche mais est plus faible dans l'atrium, chez les patients en IC. Ces résultats suggèrent que l'apeline et son récepteur peuvent contribuer à la pathophysiologie de l'IC chez l'homme.

Plusieurs études sur différents modèles animaux ont permis de mieux déterminer les rôles de l'apeline dans les pathologies cardiovasculaires. Elle régule la survie des cellules, l'hypertrophie, la dilatation, la contractilité, l'inflammation, la fibrose, l'angiogenèse, la vasodilatation, la vasoconstriction et le stress oxydatif.

En 2002, Szokodi et son équipe ont été les premiers à montrer l'importance physiologique de l'apeline. En effet, la perfusion de la protéine recombinante induit un puissant effet inotrope dans des cœurs isolés de rat (Szokodi *et al.*, 2002). Une étude *in vivo* a confirmé cette fonction dans des cœurs de rats normaux ou en insuffisance cardiaque. Le traitement avec l'apeline restaure la position du récepteur APJ au niveau de la membrane et relance le mécanisme de contractilité myocardique (Berry *et al.*, 2004). Chez la souris, le peptide apeline réduit la pré-charge et la post-charge du ventricule gauche et augmente la réserve contractile sans évidence d'hypertrophie (Ashley *et al.*, 2005).

Après invalidation du gène apeline, des souris transgéniques affichent une dilatation progressive du ventricule gauche et une dysfonction systolique à 6 mois. Après une surcharge de pression, la perte d'apeline n'affecte pas la réponse hypertrophique mais diminue la fonction contractile et augmente le diamètre du ventricule gauche plus fortement que chez les souris non mutées (Kuba *et al.*, 2007).

Dans un modèle d'ischémie-reperfusion, l'apeline atténue la mort cellulaire et le stress oxydatif en diminuant la production de ROS (espèces oxygénées réactives). Elle stimule l'expression d'eNOS (endothelial nitric oxide synthase), diminue la pression de perfusion et supprime la production de superoxide dans les cardiomyocytes (X. J. Zeng *et al.*, 2009). L'apeline retarde l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, qui cause la perte de l'intégrité de la membrane et une diminution de la production d'énergie. Elle préserve la structure cellulaire et réduit les dommages myocardiques (Simpkin *et al.*, 2007).

Foussal et coll. ont montré également que le traitement chronique par l'apeline atténue l'hypertrophie du ventricule gauche induite par une surcharge de pression. Ceci est associé à une augmentation de l'activité de la catalase et une diminution du stress oxydatif (Foussal *et al.*, 2010). Dans ce même modèle, Pchejetski et coll. ont mis en évidence une atténuation du développement du remodelage fibrotique cardiaque et de la production de collagène par l'apeline, à travers l'inhibition de la sphingosine kinase 1 et le ralentissement de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes induite par le TNF- α (Pchejetski *et al.*, 2012).

En 2012, une étude administrant l'apeline-13 chez des rats en IC avancée a montré une amélioration de la fonction cardiaque et du remodelage, une diminution du stress oxydatif, une régulation de la voie Akt/eNOS, et une restauration de l'expression de apeline/APJ (Koguchi *et al.*, 2012).

D'autre part, l'apeline a montré son caractère cardioprotecteur chez les souris obèses en atténuant l'hypertrophie cardiaque ainsi que la dysfonction contractile et en restaurant les niveaux protéiques de SERCA2a et du phospholambane (Ceylan-Isik *et al.*, 2013). Dans un modèle d'ischémie-reperfusion associé à un régime gras, ce peptide permet de réduire la mort cellulaire, la taille de l'infarctus et l'inflammation en empêchant la translocation nucléaire du facteur de transcription FOXO3 impliqué dans l'apoptose, la survie cellulaire et le stress oxydatif (Boal *et al.*, 2015).

Enfin, la surexpression de l'apeline dans des cellules de la moelle osseuse améliore le recrutement de ces cellules et accélère la réparation du cœur après infarctus via la régulation de la Sirtuine 3 (L. Li *et al.*, 2013). Cette histone désacétylase, qui contribue à une protection contre le stress oxydatif, agit par ailleurs sur FOXO3 (Tseng *et al.*, 2013).

Le rôle de l'apeline dans le système vasculaire sera discuté plus loin.

III. La revascularisation post-ischémique

Les vaisseaux sanguins fournissent l'oxygène et les nutriments au tissu et servent de passerelle pour la surveillance immune. Des défauts dans la structure et la fonction du réseau vasculaire sont responsables de plusieurs pathologies telles que l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, l'ischémie critique du membre inférieur ou des maladies neurodégénératives. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires diffèrent suivant le tissu. ***Dans les chapitres suivants, nous nous intéresserons essentiellement à la revascularisation dans les deux pathologies ischémiques étudiées au cours de ma thèse : insuffisance cardiaque due à l'infarctus du myocarde et ischémie critique du membre inférieur.***

Après l'apparition de l'ischémie, le muscle cardiaque et les muscles squelettiques de la jambe subissent un ensemble de réponses moléculaires, cellulaires et extracellulaires. Le processus de réparation du tissu peut être divisé en trois grandes phases comme décrites précédemment pour le remodelage cardiaque :

- la nécrose et l'apoptose dues à l'hypoxie, l'hypoperfusion et les dérégulations métaboliques ;
- la phase inflammatoire où l'on retrouve les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes migrant vers le tissu nécrotique pour éliminer les débris cellulaires ;
- la phase de remodelage et de régénération associée à la migration et la différenciation des myofibroblastes, au dépôt de matrice extracellulaire et éventuellement à la formation d'un tissu cicatriciel pour remplacer les cellules nécrotiques.

Au cours de cette dernière phase, la formation de nouveaux vaisseaux et/ou le remodelage du réseau vasculaire préexistant ont lieu, principalement sous le contrôle d'un programme pro-angiogénique local, d'une balance inflammatoire et de cellules progénitrices vasculaires circulantes ou présentes localement. Quatre processus différents mais complémentaires permettent le développement d'un réseau fonctionnel : la vasculogenèse, l'angiogenèse, l'artériogenèse et la croissance collatérale. Dans l'ischémie pathologique, ces processus agissent de concert pour revasculariser le territoire impacté. L'artériogenèse et le remodelage du réseau vasculaire préexistant mènent probablement à une forte augmentation du flux sanguin dans la zone lésée alors que le développement de nouveaux capillaires, faisant partie du processus de vasculogenèse et d'angiogenèse, empêche la destruction massive du tissu (Silvestre *et al.*, 2013).

Dans une première partie, nous aborderons le développement d'un réseau fonctionnel, du bourgeonnement à la maturation. Nous détaillerons ensuite les mécanismes d'induction et de stimulation de la revascularisation, en s'arrêtant sur l'implication de trois facteurs pro-angiogéniques étudiés au cours de ma thèse (apeline, FGF2 et Cyr61) pour leur potentiel dans le traitement de l'IC et de l'ischémie critique des membres inférieurs. Enfin la troisième partie mettra en avant l'intérêt de la thérapie angiogénique.

III. 1) Les mécanismes cellulaires du développement d'un réseau vasculaire fonctionnel

Pour revues (Carmeliet, 2000; Lorier *et al.*, 2011; Silvestre *et al.*, 2013)

III. 1. a) La vasculogénèse

La vasculogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux. La croissance vasculaire chez l'embryon débute par ce processus. Cependant, des expériences dans des modèles d'ischémie du membre inférieur ont suggéré que la vasculogénèse peut avoir lieu dans l'organisme adulte et contribuer à une réponse vasculaire adaptative à l'ischémie du tissu (Takahashi1999ischemia- cytokine-). La vasculogénèse se traduit par la prolifération de cellules souches et progénitrices endothéliales qui se différencient ensuite pour former localement des tubes de cellules endothéliales. Ces tubes primitifs se joignent entraînant la création d'un réseau appelé plexus vasculaire. Ce réseau n'est pas encore différencié ni fonctionnel, le flux sanguin y est chaotique.

III. 1. b) L'angiogénèse

L'angiogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux à partir du lit vasculaire existant. Elle constitue l'étape suivante de la vascularisation. Le plexus se différencie, s'organise et devient un réseau de capillaires (après l'attachement des péricytes), d'artéioles pré-capillaires (après l'attachement des cellules musculaires lisses) et progresse vers de petites artères (avec de multiples couches de cellules musculaires lisses dans la média vasculaire). L'angiogénèse peut se dérouler selon trois mécanismes : par bourgeonnement (ou « sprouting »), par élargissement et séparation des vaisseaux déjà formés (intussusception) ou par septation où les cellules poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés (« bridging »). **Nous nous intéresserons essentiellement au bourgeonnement angiogénique** (Figure 2).

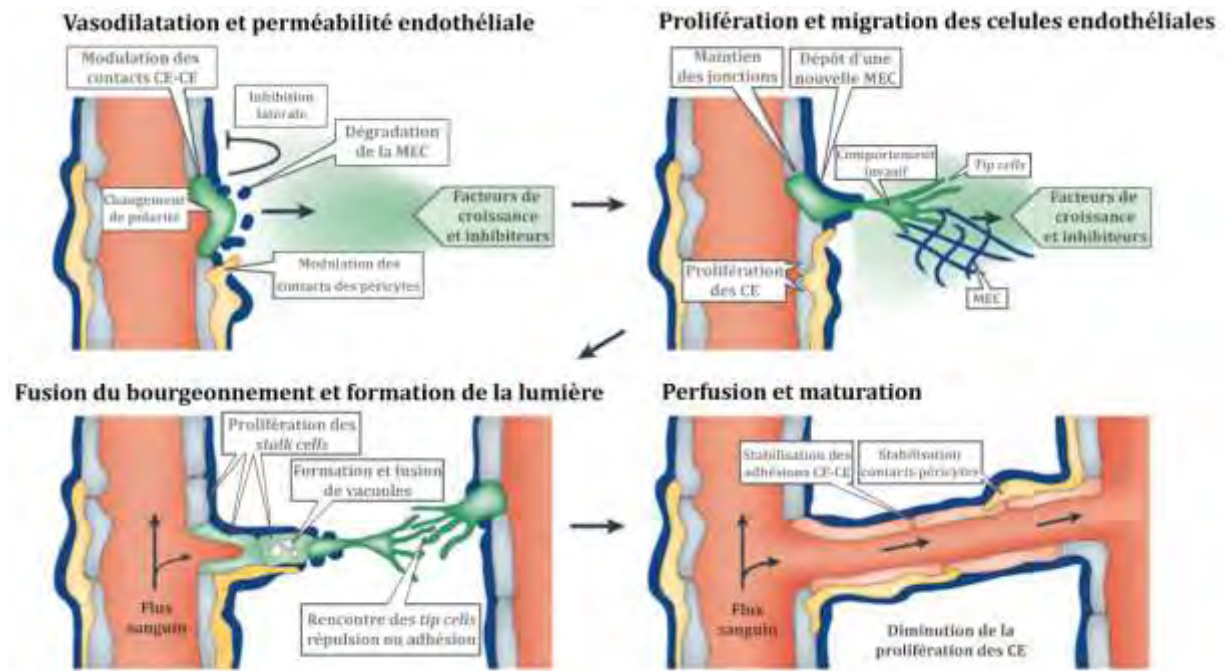


Figure 2 : Processus du bourgeonnement angiogénique

CE : cellules endothéliales, MEC : matrice extracellulaire. Adapté de (R. H. Adams et Alitalo, 2007)

Vasodilatation et perméabilité endothéliale

Le bourgeonnement débute par la vasodilatation, un processus impliquant le NO (monoxyde d'azote). La perméabilité vasculaire augmente en réponse à VEGF (vascular endothelial growth factor), permettant l'extravasation de protéines plasmatiques ayant pour rôle de favoriser la migration des cellules endothéliales. Bien que la perméabilité soit nécessaire à l'angiogenèse, une fuite vasculaire excessive peut mener à certaines pathologies comme la formation d'adhérence, des œdèmes ou l'hypertension intracrânienne.

Par la suite, pour que les cellules endothéliales migrent à partir de leur site de résidence, un relâchement des contacts entre ces cellules est nécessaire. Les cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses) se détachent de la paroi vasculaire, ce qui augmente la perméabilité. La matrice extracellulaire est alors dégradée par des protéinases. L'angiopoïétine 2 (Ang-2) peut être impliquée dans le détachement des cellules musculaires lisses et la perte de la matrice. Des protéinases telles que les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA), certaines MMP, des chymases ou des héparanases influencent l'angiogenèse en dégradant les molécules de la matrice, et en activant ou libérant des facteurs de croissance (FGF2, VEGF, IGF-1 (insulin-like growth factor 1)) (Figure 2).

Prolifération et migration des cellules endothéliales

La matrice extracellulaire étant dégradée, les cellules endothéliales proliférantes peuvent migrer vers des sites distants. Un certain nombre de facteurs sont impliqués dans ce processus. On retrouve :

- la famille des VEGF,
- Ang-1 qui est chimiotactique pour les cellules endothéliales et qui induit le bourgeonnement et potentialise VEGF,
- des membres de la famille des FGF, comme FGF1 et FGF2 qui ont une activité mitotique et pro-migratoire.
- des membres de la famille des PDGF (platelet-derived growth factor) qui affectent l'angiogenèse en recrutant des cellules mésenchymateuses ou inflammatoires.
- ou encore des molécules impliquées dans les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice, comme l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui permettent la migration et l'étalement des cellules endothéliales.

Le bourgeonnement microvasculaire est guidé par des cellules endothéliales spécialisées nommées *tip cells*, alors que les cellules endothéliales voisines, nommées *stalk cells*, prolifèrent pour allonger le bourgeonnement (Figure 2).

Formation de la lumière

Les cellules endothéliales s'assemblent en tubes pleins et acquièrent par la suite une lumière. L'amincissement des cellules endothéliales et la fusion des vaisseaux préexistants permettent aux vaisseaux d'augmenter leur diamètre et leur longueur (Figure 2). Ang-1 en association avec VEGF accroît le diamètre luminal. Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et α_5 participent également à la formation de la lumière alors que la thrombospondine-1 en est un inhibiteur endogène.

Survie endothéliale

Une fois assemblées en nouveaux vaisseaux, les cellules endothéliales deviennent quiescentes et survivent plusieurs années. VEGF et Ang-1 accroissent leur survie alors qu'Ang-2 la réprime, au moins en absence de stimulus angiogénique. Les forces hémodynamiques sont essentielles pour maintenir le réseau ; les contraintes de cisaillement (*shear stress*) physiologiques réduisent le renouvellement endothélial et abolissent l'apoptose des cellules induite par le TNF- α . L'apoptose peut être aussi stimulée par le NO,

les ROS (évoqués précédemment) ou l'angiostatine, ou être induite par une rupture des interactions entre la matrice et les cellules endothéliales.

Différenciation endothéliale et remodelage

Les cellules endothéliales se différencient ensuite pour stabiliser les néovaisseaux. Elles acquièrent des caractéristiques spécifiques du tissu pour s'adapter aux demandes du micro-environnement. La maturation du réseau endothélial passe ensuite par le remodelage, l'uniformisation des capillaires et l'organisation régulière et structurée du réseau (Figure 2). Des études montrent l'implication de VEGF, de Tie-1, de certaines molécules d'adhésion ou des intégrines dans ce remodelage (Carmeliet *et al.*, 1996; Carmeliet *et al.*, 1999; Patan, 1998).

III. 1. c) L'artériogenèse et stabilisation du réseau formé

L'artériogenèse consiste en la croissance des artères collatérales musculaires avec l'élargissement de la lumière pour une réponse compensatoire au rétrécissement ou à l'occlusion de plus larges artères. Les gradients de pression élevés jouent un rôle important dans ce remodelage en activant certains facteurs. La stabilisation du réseau formé peut ensuite avoir lieu pour compléter la maturation des vaisseaux. La consolidation des parois vasculaires passe par leur épaissement, par le recrutement et la prolifération des cellules musculaires lisses et par la production de matrice extracellulaire. En parallèle, des péricytes se positionnent autour des capillaires. Les artères de résistance, suivies des artères de conductance, sont générées par le développement de leur média puis de l'adventice. Les cellules musculaires lisses conservent un phénotype sécrétoire : elles synthétisent des facteurs de croissance et des composants de la matrice extracellulaire. Les propriétés contractiles de ces cellules sont les dernières à se développer. L'origine, le nombre, le type et l'arrangement des cellules murales ainsi que la composition de la matrice extracellulaire dépendent du site et de la fonction du réseau concerné.

III. 1. d) La croissance collatérale

La croissance collatérale est le développement et le remodelage d'artéριοles préexistantes qui ont généralement un faible flux sanguin, pour former des artères fonctionnelles. Les artères collatérales forment des connections entre les artères principales responsables de la plupart du flux sanguin. La circulation collatérale, où le flux sanguin est très faible dans des conditions physiologiques, peut se développer en une structure vasculaire fonctionnelle. Dans des conditions favorables, cette structure peut être largement suffisante pour assurer

la perfusion locale après l'occlusion d'une artère majeure, protégeant alors les tissus ischémiques de la nécrose.

III. 2) Les mécanismes d'induction et de stimulation de la revascularisation

Pour revues (Carmeliet, 2000; Cochain *et al.*, 2013; Silvestre *et al.*, 2013)

III. 2. a) Le stimulus initial de la revascularisation : l'hypoxie

L'hypoxie du tissu est définie comme une diminution locale de la concentration ou de la pression partielle en oxygène. Au cours de l'ischémie, la perfusion est réduite et les niveaux d'oxygène sont trop faibles pour satisfaire les besoins métaboliques.

HIF activé par l'hypoxie

La principale voie de signalisation induite par l'hypoxie implique l'activation d'un facteur de transcription, HIF (hypoxia-induced factor). Il induit l'expression de facteurs de croissance et initie le processus d'angiogenèse dans la zone ischémique à partir du réseau vasculaire préexistant. Ce facteur est essentiellement non fonctionnel dans les cellules oxygénées puisqu'il est dégradé, cependant il est stabilisé et devient actif en présence d'un stress hypoxique ou dans d'autres conditions particulières telles que la stimulation autocrine par des facteurs de croissance ou des hormones. HIF est un hétérodimère constitué d'une sous-unité α , sensible à l'oxygène, et d'une sous-unité constitutive β . En conditions hypoxiques, la protéine HIF1 α est transloquée au noyau où elle interagit avec HIF β . L'hétérodimère ainsi formée se lie aux séquences HRE (hypoxia response element) présentes dans les régions promotrices de gènes de certains facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF-A. Ils agissent à travers des mécanismes autocrines ou paracrines sur la migration, la prolifération et la survie des cellules ciblées.

Des souris invalidées pour le gène HIF1 α meurent rapidement au stade embryonnaire (Iyer *et al.*, 1998) tandis qu'une variation dans le génotype de HIF1 α , lui faisant perdre sa fonction, influence le développement des vaisseaux collatéraux de l'artère coronaire chez des patients atteints de maladies cardiaques ischémiques (Resar *et al.*, 2005). Dans beaucoup de modèles expérimentaux, l'augmentation de cette protéine initie la formation de l'arbre vasculaire et le remodelage.

Le rôle de HIF2 α a récemment été découvert dans la revascularisation post-ischémique. Son inactivation dans les cellules endothéliales augmente la densité des capillaires et change paradoxalement le flux sanguin, reflétant probablement un défaut ou une insuffisance dans la croissance collatérale. Ces cellules, dans lesquelles HIF2 α a été invalidé, ont également de fortes capacités migratoires et invasives corrélées à de fortes concentrations en facteurs pro-angiogéniques tels que Dll4 (delta-like ligand 4), un ligand du récepteur Notch. La voie Dll4/Notch est une cible de HIF2 α dans les cellules endothéliales, et joue un rôle dans l'organisation et la perfusion du réseau vasculaire dans les muscles ischémiques.

HIF module la réponse à l'hypoxie en contrôlant l'expression d'acteurs clés impliqués dans la néogenèse et le remodelage vasculaire. Parmi eux se trouvent le VEGFA, son récepteur VEGFR1, l'apeline, le CXCL12 (stroma-derived factor 1 ou SDF1), l'angiopoïétine 2 (Ang-2), le PDGF-BB (platelet-derived growth factor) et le SCF (stem cell factor ou c-Kit ligand).

La famille des VEGF et leur rôle dans l'angiogenèse

La famille des VEGFs est composée de cinq membres chez les mammifères (VEGFA souvent appelé VEGF, VEGFB, VEGFC, VEGFD et PlGF: Placenta-like Growth Factor). Ces protéines interagissent avec trois récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3) exprimés entre autre à la surface des cellules endothéliales.

VEGFA est induit au niveau transcriptionnel par HIF1 α et au niveau traductionnel grâce à la présence, en 5' de son ARNm, de deux IRES (internal ribosome entry site) indépendants (Bornes *et al.*, 2007). Les IRES permettent l'expression dans des conditions de stress lorsque le mécanisme classique de traduction dépendant de la coiffe est inhibé. *Ils seront décrits plus en détails par la suite.* VEGFA se lie aux récepteurs VEGFR1 et 2 dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Ishida *et al.*, 2001; Silvestre *et al.*, 2013). L'activation de ces récepteurs déclenche différentes voies de signalisation qui stimulent la croissance vasculaire. VEGFA peut activer la prolifération et la survie des cellules. Son gène est composé de huit exons qui peuvent subir un épissage alternatif et générer au moins sept isoformes différentes (d'une taille de 121, 145, 148, 165, 183, 189 ou 206 acides aminés), le plus abondant étant le VEGFA₁₆₅ (Giacca et Zacchigna, 2012). VEGF₁₈₉ est connu pour diminuer le diamètre de la lumière, alors que VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ et leurs récepteurs augmentent la formation de la lumière, en plus d'augmenter la longueur des vaisseaux. VEGF₁₂₁ ne se lie pas à l'héparine et est donc relargué librement par les cellules le produisant alors que 50-70% de VEGF₁₆₅ reste associé à la cellule ou à la matrice extracellulaire (Houck *et al.*, 1992).

Le NO décrit préalablement pour son rôle dans le stress oxydatif participe directement à l'effet de VEGFA. Dans un modèle d'ischémie du membre inférieur, la réponse angiogénique de VEGFA est dépendante d'eNOS (endothelial nitric oxide synthase) (Murohara *et al.*, 1998). De même, à la suite d'un infarctus du myocarde, l'induction de l'angiogenèse est dépendante de VEGF et de la production de NO (Matsunaga *et al.*, 2000).

L'expression d'autres membres de la famille des VEGFs est aussi induite directement ou indirectement par l'hypoxie et/ou HIF. Le PlGF qui se lie au récepteur VEGFR1 active la néovascularisation dans les tissus ischémiques (Luttun *et al.*, 2002). L'inactivation de cette protéine affecte l'angiogenèse pathologique mais pas physiologique (Carmeliet *et al.*, 2001). L'expression de VEGFB est également augmentée dans la zone ischémique. Son rôle dans l'angiogenèse est source de débats car il serait restreint à certains types de tissus ischémiques, tels que le cœur dans lequel il semble avoir un effet majeur sur le développement des vaisseaux coronaires épicaux. Son effet dans l'angiogenèse post-ischémique peut aussi dépendre de ses capacités à contrôler la survie des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses dans la paroi du vaisseau.

En plus de son rôle dans la lymphangiogenèse, VEGFC exprime son pouvoir angiogénique dans la pathologie adulte, en se liant à VEGFR3. Il est induit par l'hypoxie au niveau traductionnel par la présence d'un IRES (Morfoisse *et al.*, 2014). Il est mitogène et chimiotactique pour les cellules endothéliales. Il stimule le relargage de NO par ces mêmes cellules et augmente la perméabilité vasculaire. Il est également un régulateur essentiel de la stabilisation vasculaire à travers un mode d'action paracrine en régulant l'expression de PDGF-BB. VEGFD sous sa forme mature induit un fort effet angiogénique, artériogénique et lymphangiogénique dans le muscle squelettique ischémique (Rissanen *et al.*, 2003) et augmente la perfusion du myocarde (Rutanen *et al.*, 2004).

L'apeline et ses effets vasculaires

Le gène humain de l'apeline contient une séquence HRE localisée dans le premier intron, avec laquelle interagit HIF. Des études ont démontré que son expression est induite par l'hypoxie dans les cellules endothéliales et musculaires lisses en culture, dans les poumons de souris exposées à l'hypoxie (Eyries *et al.*, 2008), et également dans le cœur et le muscle squelettique après infarctus du myocarde chez la souris (A. Y. Sheikh *et al.*, 2008). Le rôle de l'apeline dans le développement vasculaire a été mis en évidence dans l'embryogenèse et le système cardiovasculaire. En effet, on la détecte dans les régions entourant les vaisseaux sanguins présumés chez l'embryon agissant alors fortement sur l'angiogenèse requise pour le développement vasculaire normal (Cox *et al.*, 2006). Il a été montré également que

l'apeline agit de façon autocrine et paracrine dans l'angiogenèse embryonnaire et tumorale (Kalin *et al.*, 2007) et qu'elle et son récepteur APJ sont impliqués dans la formation du cœur au cours de la gastrulation (X. X. Zeng *et al.*, 2007).

Par la suite, une étude a démontré que la surexpression de l'apeline est associée à une augmentation de l'angiogenèse et à une amélioration de la fonction cardiaque dans des souris diabétiques après infarctus du myocarde et ce, via la surrégulation de la sirtuine 3 (H. Zeng *et al.*, 2014). En effet, l'apeline permet l'augmentation de la densité capillaire et artériolaire *in vivo* et favorise le bourgeonnement des vaisseaux dans des explants aortiques. Sa surexpression induit notamment l'augmentation de VEGF/VEGFR2, et de Ang-1/Tie-2, deux systèmes qui ont un rôle critique dans la régulation de la maturation vasculaire et l'angiogenèse. De plus, l'apeline joue un rôle dans le diamètre des vaisseaux sanguins au cours de l'angiogenèse, augmente la prolifération des cellules endothéliales en présence de VEGF et favorise l'agrégation cellules-cellules (Kidoya *et al.*, 2008).

Tatemoto a montré que l'interaction apeline-APJ au niveau vasculaire induit la vasodilatation à travers le relargage de NO dans les cellules endothéliales avec une diminution importante dans la résistance vasculaire systémique, en réduisant la pré-charge et la post-charge du ventricule gauche (Tatemoto *et al.*, 2001). Dans un modèle d'athérosclérose, l'apeline bloque les actions de l'angiotensine II en augmentant la production de NO et en inhibant sa voie de signalisation, ce qui a donc pour conséquence d'annuler ses effets sur l'athérosclérose (Chun *et al.*, 2008). De plus, Japp et son équipe ont été les premiers à rapporter les effets vasculaires chez des patients en IC (Japp *et al.*, 2010). Ils ont noté que l'administration de l'apeline induit une vasodilatation périphérique et coronarienne. Chez le sujet sain, la vasodilatation artérielle générée par l'apeline est dépendante de NO (Japp *et al.*, 2008).

Enfin, dans la veine saphène chez l'homme, l'apeline-13 a un pouvoir vasoconstricteur mais de faible efficacité ce qui est en accord avec la faible densité des récepteurs à haute affinité localisés dans les cellules musculaires lisses (Katugampola *et al.*, 2001).

FGF1, FGF2 et leur rôle dans l'angiogenèse

La famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) comprend 23 membres qui jouent des rôles clés dans les processus de prolifération et de différenciation d'une grande variété de tissus et de cellules incluant les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Les FGF sont critiques au cours du développement des vertébrés et invertébrés et toute irrégularité dans leur fonction mène à la mort prématurée ou à des altérations phénotypiques (Itoh, 2007). Certains FGF sont connus pour favoriser

l'angiogenèse dans des conditions pathologiques, comme le cancer (Korc et Friesel, 2009). Leur sécrétion stimule la synthèse de protéases qui contribue à l'angiogenèse en digérant la matrice extracellulaire (Roncalli *et al.*, 2010).

En particulier, FGF1 (ou acide FGF) et FGF2 (ou basic FGF), par leur pouvoir mitotique et leurs activités pro-migratoires, sont considérés comme les facteurs les plus importants pour stimuler la prolifération endothéliale et l'organisation physique des cellules endothéliales en tubes. Ils favorisent notamment l'angiogenèse dans différents cancers (Cenni *et al.*, 2007; Kwabi-Addo *et al.*, 2004). Ces deux facteurs, contrairement aux autres membres de la famille, ne possèdent pas de séquence de sécrétion ; l'isoforme de 18kDa de FGF2, la seule à être sécrétée, et le FGF1 sont transloqués à la membrane avant d'être exportés vers le compartiment extracellulaire (Florkiewicz *et al.*, 1995; A. Jackson *et al.*, 1992; Prudovsky *et al.*, 2008). Les FGF exercent leurs effets biologiques à travers leur interaction avec les récepteurs FGFR à la surface des cellules, au nombre de quatre chez les mammifères. FGF1 et FGF2 sont des ligands de tous les récepteurs (Powers *et al.*, 2000). Ils sont induits par l'hypoxie et l'ischémie (Endoh *et al.*, 1994; Kuwabara *et al.*, 1995). Bien que FGF2 possède une séquence HRE, celle-ci n'est pas fonctionnelle. FGF2 est induit par l'hypoxie non pas au niveau transcriptionnel mais au niveau traductionnel grâce à la présence d'un IRES en 5' de son ARNm (Conte *et al.*, 2008). De même, le stress oxydatif favorise la traduction IRES-dépendante de FGF2 (Arguelles *et al.*, 2014). L'ARNm de FGF1 possède également un IRES, connu pour être actif au cours de la différenciation des myoblastes (Conte *et al.*, 2009; Martineau *et al.*, 2004). Mon équipe a récemment démontré que l'IRES de FGF1 est également activé par l'hypoxie dans des cardiomyocytes *in vitro* (Hantelys et coll., en préparation).

Au stade du développement, FGF1 facilite l'augmentation de l'angiogenèse capillaire qui a lieu au cours de la maturation des cardiomyocytes et du remodelage ventriculaire (Engel *et al.*, 2006; Engelmann *et al.*, 1993; Garbayo *et al.*, 2016). FGF2 est nécessaire pour le développement normal du système vasculaire et pour la circulation efficace des cellules sanguines chez l'embryon (Leconte *et al.*, 1998).

Le FGF1 est un polypeptide exprimé par une grande variété de cellules, notamment les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses. C'est un facteur mitogène pour de nombreux types cellulaires incluant les cellules endothéliales. Il est connu pour induire l'angiogenèse *in vivo*. L'ischémie myocardique augmente son expression dans le fluide péricardique humain (Iwakura *et al.*, 2000).

Le FGF2, quant à lui, se présente sous cinq isoformes produites par un seul ARNm grâce à l'utilisation de cinq codons initiateurs alternatifs (Arnaud *et al.*, 1999; H. Prats *et al.*, 1989). L'isoforme de 18kDa qui est sécrétée, possède une activité biologique pouvant induire l'angiogenèse *in vivo*. Elle est produite également par de nombreuses cellules, comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules myocardiques. FGF2 induit la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales de façon autocrine (Murakami et Simons, 2008). Ses effets peuvent cependant être en partie indirects. En effet, FGF2 induit l'expression de VEGF dans les cellules endothéliales et inversement, la neutralisation de VEGF bloque les effets pro-angiogéniques de FGF2. Il agit de façon synergique avec VEGF sur la différenciation endothéliale et l'angiogenèse *in vivo* (Bikfalvi *et al.*, 1997). Il peut induire également l'expression de d'autres cytokines pro-angiogéniques telles que HGF (hepatocyte growth factor) (Murakami et Simons, 2008).

L'angiogenèse induite par FGF2 dans la cornée de souris, permet la formation de vaisseaux sanguins matures et stables alors que la néovascularisation stimulée par VEGF génère des microvaisseaux désorganisés et perméables (Cao *et al.*, 2004). Dans l'ischémie du membre inférieur, la surexpression de VEGF₁₆₅ induit une accélération de la perte du membre contrairement à FGF2 qui améliore la perfusion sanguine (Masaki *et al.*, 2002).

En terme d'application thérapeutique dans l'ischémie du membre inférieur, FGF2 joue un rôle important dans la croissance des collatérales et la formation des capillaires. Il est sécrété par les monocytes activés et induit la prolifération des cellules musculaires lisses, indispensables à la maturation des vaisseaux. L'administration de FGF2 permet l'induction de l'artériogenèse et améliore la survenue des lésions (Baffour *et al.*, 1992; Rayssac *et al.*, 2009; Walgenbach *et al.*, 1995).

Dans le myocarde, FGF2 est régulé positivement en réponse à un dommage ou un stress chronique au niveau transcriptionnel et traductionnel (Detillieux *et al.*, 2003). Après infarctus du myocarde, FGF2 est surexprimé, et principalement dans les cellules endothéliales (T. Zhao *et al.*, 2011) ce qui suggère que FGF2 est impliqué dans l'angiogenèse et la réparation cardiaque. De nombreuses études ont montré que l'administration de FGF2 favorise la revascularisation après un infarctus du myocarde (Battler *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1998).

Cyr61 et ses effets sur la vascularisation

Cyr61 est le premier membre identifié de la famille des CCN (pour Cyr61-CTGF-NOV) (O'Brien 1990). Cinq autres membres composent cette famille : CTGF (connective tissue growth factor) ou CCN2, NOV (nephroblastoma overexpressed) ou CCN3 puis WISP-1, WISP-

2 et WISP-3. Ces protéines appartiennent à la même famille car elles partagent une même organisation structurale. A partir de l'extrémité amino-proximale, elles contiennent un peptide signal et sont formées successivement de quatre modules structuraux apparentés aux protéines liant les IGF (module 1), au motif C de la protéine de von Willebrand (module 2), à la thrombospondine (module 3) et à un motif désigné *cysteine knot* présent dans certains facteurs de croissance (module 4) (Perbal, 2004). Ces caractéristiques suggèrent que ces protéines ont des activités multiples et qu'elles agissent dans plusieurs voies de signalisation. En effet, les CCN sont sécrétées et associées à la matrice extracellulaire et régulent la migration, la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la survie des cellules (Lau et Lam, 1999).

Plus particulièrement, des études ont montré que Cyr61 est associé à la matrice extracellulaire (Yang et Lau, 1991) et supporte l'adhésion cellulaire en se liant directement aux récepteurs des intégrines (Kireeva *et al.*, 1998; Kireeva *et al.*, 1996). Ces résultats ainsi que le fait que Cyr61 n'induit pas la prolifération cellulaire de part lui-même mais stimule seulement la synthèse d'ADN induite par d'autres mitogènes, mènent à considérer Cyr61 comme une protéine de la matrice extracellulaire plutôt qu'un facteur de croissance classique (Lau et Lam, 1999). Il favorise par exemple la synthèse d'ADN induite par FGF2 dans les cellules endothéliales, et agit en libérant les protéines FGF2 liées à la matrice extracellulaire, augmentant alors la concentration effective de FGF2 qui peut exercer son pouvoir mitogène sur ces cellules (Kolesnikova et Lau, 1998).

Cyr61 présente comme d'autres membres des CCN, des activités multiples et polyvalentes. Il favorise la survie cellulaire mais peut à la fois déclencher l'apoptose. Il augmente la prolifération cellulaire mais induit aussi l'arrêt du cycle. Il encourage la croissance tumorale mais supprime pourtant la tumorigenèse dans certains contextes. Ces activités disparates peuvent maintenant être attribuées en grande partie à ses interactions avec des intégrines distinctes et les HSPG (heparan sulfate proteoglycans) suivant le type cellulaire et le contexte (Lau, 2011).

Cyr61 est activé au niveau transcriptionnel par, entre autres, les voies de signalisation de PDGF et FGF2 (O'Brien *et al.*, 1990), du TGF- β 1 (Brunner *et al.*, 1991), de l'angiotensine II (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2004; Hilfiker *et al.*, 2002) ainsi que par l'hypoxie (Kunz *et al.*, 2003). Il est induit par HIF1- α en hypoxie dans le mélanome (Kunz *et al.*, 2003) et dans les cellules endothéliales de la rétine en réponse à une stimulation avec VEGF et permet également l'activation de la voie de signalisation de Notch (Chintala *et al.*, 2015; You *et al.*, 2010). Cyr61 est également régulé par HIF1 α dans une lignée cellulaire de trophoblaste (Wolf *et al.*, 2010). Au contraire, dans des cellules de cancer gastrique, Cyr61 semble induire HIF1- α (M.

T. Lin *et al.*, 2008), alors que l'augmentation de l'expression de Cyr61 est indépendante de HIF1 et HIF2 dans des fibroblastes embryonnaires (NIH3T3), ou dans des cellules embryonnaires de rein (HEK-293T) (Meyuhas *et al.*, 2008). FOXO3a est connu pour inhiber Cyr61, ce qui mène alors à la diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses et de l'hyperplasie néointimale (H. Y. Lee *et al.*, 2007a).

Cyr61 augmente la migration et l'adhésion des cellules endothéliales vasculaires *in vitro* et induit la néovascularisation de la cornée *in vivo* (Babic *et al.*, 1998; Di *et al.*, 2015). Ce rôle a été confirmé dans un modèle d'ischémie de la patte chez le lapin où Cyr61 permet d'améliorer la perfusion (Fataccioli *et al.*, 2002), ou chez la souris où il augmente la densité capillaire et la perfusion et réduit la nécrose des tissus (Rayssac *et al.*, 2009). L'activité pro-angiogénique de Cyr61 est attribuée à sa liaison à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ fortement exprimée dans les cellules endothéliales (McNeill *et al.*, 2015). La fonction de Cyr61 serait également de promouvoir la prolifération, la survie et la formation de tubes (Leu *et al.*, 2002).

De plus, chez les embryons qui n'expriment pas Cyr61, les cellules endothéliales et musculaires lisses ne sont pas confinées dans leurs couches (Mo *et al.*, 2002). La suppression de Cyr61 uniquement dans les cellules endothéliales mène à la formation de vaisseaux plus larges, sans péricytes et une perte de l'organisation des artères, capillaires et veines (Chintala *et al.*, 2015).

Il a également été mis en évidence que Cyr61 est essentiel pour le développement cardiovasculaire au cours de l'embryogenèse (Mo et Lau, 2006). Il joue un rôle dans le recrutement de cellules progénitrices, améliorant alors la prolifération endothéliale et la néovascularisation dans le système cardiovasculaire (Grote *et al.*, 2007). Après un infarctus du myocarde chez la souris, l'expression de Cyr61 est fortement induite dans le ventricule gauche dans la zone ischémique et également à distance. Son expression protéique a également été notée dans les cardiomyocytes de patients atteints de cardiomyopathies ischémiques avancées alors qu'il est presque absent dans les cœurs sains (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2004).

Enfin, le gène Cyr61 est fortement exprimé au niveau de sites inflammatoires et de réparation du tissu. Des niveaux importants de Cyr61 ont été retrouvés dans l'athérosclérose (Schober *et al.*, 2002). En cohérence avec son rôle dans l'inflammation, il est également induit par des cytokines inflammatoires IL-1 et TNF- α (Gashaw *et al.*, 2008).

III. 2. b) Inflammation et revascularisation

Les cellules inflammatoires recrutées au niveau des sites ischémiques jouent un rôle actif dans le remodelage vasculaire et tissulaire de l'ischémie de la jambe ou post-infarctus. Dans la plupart des cas, elles mènent à l'induction de nombreux facteurs pro-angiogéniques et pro-artériogéniques. Cependant, l'effet des différents facteurs de la composante inflammatoire dépend de l'environnement local. L'état d'activation et de différenciation de chaque type cellulaire des cellules inflammatoires est également important. Les macrophages et les cellules dendritiques différenciées sont par exemple moins capables de promouvoir la néogenèse vasculaire que les monocytes. De plus, les cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-18 et IL-12 ont des activités anti-angiogéniques. Les molécules anti-angiogéniques sont produites au cours des réactions inflammatoires et participent à la réponse du tissu à l'ischémie. Par exemple, le TNF- α qui est relargué dans les premières heures de l'ischémie induit la synthèse de la molécule anti-angiogénique IL-10 par l'endothélium vasculaire. Après 24h, TGF- β diminuent la production d'IL-10, déplaçant l'équilibre vers des mécanismes activant l'angiogenèse. Similairement, la production et le relargage de la thrombospondine 1 (TSP-1) par les plaquettes diminuent la revascularisation en inhibant la MMP9 et le relargage de CXCL12.

Le rôle des monocytes

Comme évoqué rapidement dans la description du remodelage cardiaque, les monocytes et les neutrophiles sont impliqués dans le remodelage vasculaire post-ischémique. Dans un modèle d'ischémie de la jambe, les auteurs ont observés une infiltration de monocytes autour des vaisseaux et dans l'adventice des vaisseaux irrigant le territoire ischémique. Cette présence a été fortement associée avec une prolifération locale des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (Heil *et al.*, 2002). Les monocytes encouragent l'angiogenèse et la croissance collatérale de façon paracrine en sécrétant du FGF2 et du VEGF (Heil et Schaper, 2004) et MMP9 qui est impliqué dans l'émergence et les ramifications du réseau vasculaire nouvellement formé (Johnson *et al.*, 2004). Enfin, un nouveau rôle des monocytes/macrophages dans l'angiogenèse a été découvert récemment, dans lequel les macrophages favorisent la fusion des *tip cells* endothéliales menant à la formation d'un réseau vasculaire (Fantin *et al.*, 2010).

Le rôle des neutrophiles

Les neutrophiles ont un rôle jusqu'à maintenant moins bien défini dans la revascularisation des tissus ischémiques. L'élastase sécrétée par les neutrophiles a un fort pouvoir anti-

angiogénique et inhibe les effets pro-angiogéniques des autres types cellulaires. Cette protéase et la protéinase 3 induisent l'apoptose des cellules endothéliales (Preston *et al.*, 2002). Les neutrophiles sont également une source majeure de ROS (espèces oxygénées réactives), qui en surabondance peuvent endommager les cellules endothéliales en bloquant le processus d'angiogenèse. Cependant, si les neutrophiles sont stimulés par le G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) ou si l'on inhibe le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) dans un modèle d'ischémie de la patte, les neutrophiles favorisent l'angiogenèse (Ohki *et al.*, 2005; Tashiro *et al.*, 2012).

Le rôle des lymphocytes

Les lymphocytes T sont des acteurs clés dans le processus de revascularisation post-ischémique, principalement de façon paracrine à travers l'expression de VEGF. Elles sécrètent également des cytokines qui recrutent d'autres cellules inflammatoires telles que les monocytes dans la zone ischémique. L'activation préalable des monocytes par les lymphocytes T activés accroît le potentiel pro-artériogénique de ces cellules.

Les cellules NK (ou natural killer cells) sont également impliquées dans la revascularisation. Un travail sur un modèle d'infarctus du myocarde a suggéré que ces cellules amélioraient l'angiogenèse et diminuaient la fibrose (Bouchentouf *et al.*, 2010). Enfin, les lymphocytes T régulateurs contrôlent la néovascularisation en modulant la réponse inflammatoire à l'ischémie.

Le rôle des mastocytes

Les mastocytes s'accumulent dans les territoires ischémiques pouvant alors être impliqués dans l'angiogenèse et le remodelage. *In vitro*, ils libèrent des facteurs angiogéniques tels que VEGF, IL-8 et Ang-2). *In vivo*, une fois recrutés, ils produisent du VEGF. L'inhibition de leur mobilisation dans un modèle d'ischémie du membre inférieur, diminue et retarde l'induction de la néovascularisation (Heissig *et al.*, 2005). Dans le cœur, certaines études mettent en évidence un effet protecteur des agents qui relarguent les mastocytes alors que d'autres mettent en évidence des effets délétères.

L'inflammation, la revascularisation et le remodelage du tissu

Les effets de l'inflammation sur le remodelage du tissu peuvent dépendre de l'homéostasie du tissu ischémique. Les résultats obtenus dans des modèles d'ischémie modérée comme l'ischémie du membre inférieur peuvent différer de ceux obtenus dans des modèles d'infarctus du myocarde qui sont associés à une ischémie sévère et à une mort cellulaire

massive. L'intensité et la composition de la réponse immuno-inflammatoire peuvent mener à un remodelage néfaste malgré son effet activateur de la revascularisation. En effet, les lymphocytes, comme les cellules myéloïdes, ont des propriétés potentiellement délétères sur le remodelage, particulièrement après infarctus. De plus, certaines interleukines pro-inflammatoires favorisent une réaction immunitaire excessive dans le cœur et sont impliquées dans la fibrose.

III. 2. c) Les cellules souches et progénitrices vasculaires

Les cellules souches adultes sont probablement une population hétérogène de différents types cellulaires, incluant des cellules immatures et des cellules à différents stades de différenciation. Au cours de l'ischémie, le tissu recrute des cellules angiogènes, qui sont impliquées dans la restauration du réseau vasculaire. De nombreux tissus comme le cœur, la paroi vasculaire, la moelle osseuse, semblent contenir des réservoirs de cellules souches et progénitrices avec un potentiel angiogène. Les capacités régénératives de ces cellules d'origine différente sont variables et dépendent de plusieurs mécanismes, selon le type de cellules souches et le tissu ischémique concerné (Silvestre *et al.*, 2013).

Mobilisation des cellules souches et progénitrices

Au cours de la vasculogénèse, différents types de cellules souches et progénitrices endothéliales prolifèrent et se différencient en cellules endothéliales matures. Il s'agit de cellules souches hématopoïétiques (CSH), de précurseurs myéloïdes, de cellules souches mésenchymateuses (CSM) ou encore de cellules souches cardiaques (Urbich et Dimmeler, 2004). La plupart sont situées dans les niches ostéoblastiques et vasculaires de la moelle osseuse. Les pathologies ischémiques affectent ces niches et induisent la mobilisation transitoire des différents types de cellules souches. Takahashi et coll. ont montré qu'effectivement, la mobilisation des précurseurs endothéliaux est stimulée par l'ischémie mais également par le traitement avec la cytokine GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) (Takahashi *et al.*, 1999). Cette mobilisation a lieu sur une période de 7 heures à 7 jours après l'initiation de l'ischémie. L'activation et la mobilisation des cellules de la moelle sont contrôlées par plusieurs cellules, par des cytokines incluant les CSF (colony-stimulating factors) et par diverses molécules angiogéniques. Ces facteurs peuvent induire le relargage de protéases telles que les MMP2 et 9 et l'élastase produite par les neutrophiles.

Mécanismes d'action des cellules souches et progénitrices

Une fois mobilisées dans le sang périphérique, les cellules sont recrutées au niveau du territoire ischémique pour contribuer à la revascularisation et à la régénération. Elles

peuvent ensuite se différencier en cellules vasculaires ou relarguer des facteurs pour un effet paracrine (tels que des facteurs de croissance, des molécules vasoactives ou des interleukines) ou encore interagir directement avec le tissu. Ces mécanismes sont complémentaires et dépendent du type ou sous-type des cellules souches et progénitrices.

Différents types de cellules souches adultes dérivées de la moelle

La moelle osseuse contient une large variété de cellules souches adultes et a longtemps été considérée comme la source principale de cellules souches et de cellules progénitrices. De nombreuses études ont montré que ces cellules myéloïdes pouvaient se différencier en particulier en cellules avec un phénotype endothélial. Plusieurs facteurs influencent leur différenciation : VEGF, VEGFR2, FGF2, GM-CSF et IGF-1. La différenciation peut dépendre également des petites vésicules membranaires ou des microparticules générées par des cellules endothéliales apoptotiques ou activées par l'inflammation locale, probablement à travers la production de ROS (espèces oxygénées réactives).

Le rôle majeur des progéniteurs pourrait être de relarguer des facteurs angiogéniques et artériogéniques et contribuer alors à la formation de vaisseaux par un mécanisme paracrine. Par exemple, les cellules mononucléaires de la moelle injectées dans un cœur ischémique sécrète FGF2, VEGF et Ang-1 ce qui leur permet d'accroître la densité capillaire et vasculaire et le flux sanguin local (Kamihata *et al.*, 2001; Tse *et al.*, 2007). Chez l'homme, ces cellules dérivées de la moelle, après infarctus, sécrètent un cocktail de plus de 25 facteurs et cytokines avec des activités pro-angiogéniques, incluant l'angiogénine, VEGFA, HGF, FGF9 et IGF-1. Parmi les cellules mononucléaires myéloïdes, il existe différents sous-groupes qui affichent un potentiel angiogène.

Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules hématopoïétiques (CSH, cellules progénitrices hématopoïétiques, plaquettes, monocytes...) participent au processus de revascularisation dans l'ischémie du membre inférieur (Iwase *et al.*, 2005) et permettent de diminuer la taille de la cicatrice et d'accroître la densité capillaire dans un modèle d'infarctus du myocarde (Ma *et al.*, 2005). Elles peuvent relarguer des facteurs angiogéniques tels que le VEGFA, des angiopoïétines, des MMPs, qui facilitent alors l'angiogenèse ou elles peuvent se différencier en cellules endothéliales.

Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules de la moelle incluent aussi une petite population de cellules souches mésenchymateuses (CSM) caractérisées par leur adhésion au plastique, par l'expression de marqueurs de surface (CD73, CD90 et CD105), par l'absence de marqueurs hématopoïétiques (CD34, CD45, CD19, CD11a et HLA-DR), et par leur différenciation en

ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes *in vitro*. Ces cellules favorisent la revascularisation du tissu ischémique (Baksh *et al.*, 2007; Iwase *et al.*, 2005; R. Z. Lin *et al.*, 2012; D. M. Smadja *et al.*, 2007).

De plus, les CSM sécrètent des facteurs solubles qui altèrent le micro-environnement tissulaire, ce qui peut jouer un rôle plus important que leur transdifférenciation, dans la réparation du tissu. Les CSM humaines et murines relarguent un grand nombre de facteurs pro-angiogéniques tels que des facteurs de croissance (VEGF, FGF2, FGF7, IGF, PDGF, PIGF, TGF- β , Cyr61), des protéases (MMP1, MMP2, MMP9) et des facteurs impliqués dans la mobilisation et le recrutement des cellules souches et progénitrices (SCF, G-CSF) (Estrada *et al.*, 2009; Silvestre *et al.*, 2013).

Les cellules progénitrices endothéliales

Deux types de cellules progénitrices endothéliales (CPE) existent : les CPE précoces et les CPE tardives. Elles stimulent toutes deux la vascularisation (Asahara *et al.*, 1999; Asahara *et al.*, 1997) mais par des mécanismes différents. Les CPE précoces sont moins différenciées et n'intègrent pas la couche des cellules endothéliales. Elles agissent plutôt de façon paracrine. L'administration de milieu conditionné provenant d'une culture de CPE précoces a des effets pro-angiogéniques similaires à ceux observés avec l'injection directe des CPE dans l'ischémie de la patte (Di Santo *et al.*, 2009). Au contraire, les CPE tardives sont plus différenciées et s'incorporent dans l'endothélium. Elles ont un fort potentiel prolifératif et peuvent former des structures tubulaires. Ces deux populations ont probablement des effets complémentaires puisqu'administrées simultanément, elles agissent de façon synergique dans un modèle d'ischémie du membre inférieur (Yoon *et al.*, 2005).

L'activité paracrine des CPE implique le relargage de facteurs de croissance qui initient la néogenèse vasculaire dans le territoire ischémique. Elles sécrètent VEGF, HGF, G-CSF et GM-CSF dans le milieu extracellulaire, mais également des protéases (MMP, uPA) responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et du relargage des facteurs de croissance séquestrés dans cette matrice.

De plus, comme les CPE ont un phénotype endothélial et qu'elle produise eNOS (endothelial nitric oxide synthase), elles sont sans doute capables de produire du monoxyde d'azote (NO). Ce NO à travers ses activités vasodilatatrices et sa rapidité à activer MMP9 localement, favorise la revascularisation post-ischémique.

Bien que destinées à se différencier en cellules endothéliales, les CPE ont aussi la capacité de se différencier en cardiomyocytes ou présenter une plasticité relative, incapable de se différencier en cellules endothéliales matures mais suffisamment pour mimer une activité de

cellules endothéliales et servir comme composants pour le développement de tubes vasculaires. Certaines cellules peuvent également se différencier en cellules musculaires lisses et participer au remodelage vasculaire.

Autres cellules progénitrices impliquées dans la revascularisation

Les cellules progénitrices musculaires lisses

Le mécanisme d'action des cellules progénitrices musculaires lisses (CPML) semble aussi être basé sur le potentiel relargage paracrine de molécules vasoactives. Une analyse protéomique du sécrétome de ces cellules a montré qu'elles produisent quelques enzymes protéolytiques et des cytokines inflammatoires et qu'elles ont seulement une capacité invasive limitée. Le milieu conditionné obtenu à partir de cultures de CPML a aussi révélé un potentiel angiogénique très limité sur la formation de tubes endothéliaux (Simper *et al.*, 2010). Cependant, les CPML amplifient l'effet de l'injection de CPE dans un modèle d'ischémie critique de la patte (Foubert *et al.*, 2008). Elles semblent relarguer Ang-1, qui se lie à son récepteur Tie-2 à la surface des CPE, favorisant le recrutement et l'incorporation des CPE dans le réseau vasculaire préexistants.

Les cellules progénitrices cardiaques résidentes

Comme énoncé précédemment, bien que les capacités de régénération du myocarde soient généralement considérées comme pauvres, les cellules progénitrices cardiaques peuvent se différencier en différentes lignées cellulaires telles que les myocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses et permettent donc de stimuler la néovascularisation et la population en cardiomyocytes dans le cœur lésé (Beltrami *et al.*, 2003; Leri *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2010). Cependant, les mécanismes permettant cet effet thérapeutique et principalement le mécanisme de différenciation *in vivo* sont toujours controversés, plusieurs études ayant rapporté des effets contradictoires (Cochain *et al.*, 2013). Il a été néanmoins suggéré que le bénéfice des cellules progénitrices cardiaques était lié à une activité paracrine qui pourrait entre autres activer les cellules progénitrices cardiaques endogènes (Tang *et al.*, 2010).

III. 2. d) Les forces hémodynamiques

Les changements dans les forces hémodynamiques liées à la pression et aux flux sanguins qui ont lieu dans les vaisseaux collatéraux en réponse à une occlusion artérielle contribuent également à la revascularisation. Ces contraintes mécaniques influencent essentiellement les artéioles collatérales. La différence de pression sanguine entre les artéioles préexistantes connectées en amont de l'occlusion artérielle et celles connectées en aval

augmente le débit dans le lit vasculaire collatéral. Ceci engendre un *shear stress* menant à la vasodilatation des vaisseaux collatéraux, à l'amincissement de leur paroi et à l'activation et la migration des cellules murales. La réponse physiologique immédiate à la suite de l'augmentation du *shear stress* est l'activation des cellules endothéliales. Il potentialise également les communications entre ces cellules. Des communications entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses sont aussi requises pour initier le développement des vaisseaux collatéraux. Ceci se fait par le récepteur Notch à la surface des cellules musculaires lisses et ses ligands.

III. 2. e) Les hormones

La néovascularisation d'un tissu ischémique peut également être régulée par des facteurs hormonaux tels que l'angiotensine II. En plus de son rôle vasoconstricteur, cette hormone augmente la concentration en HIF1 α dans les cellules musculaires lisses vasculaires *in vitro* à un niveau bien plus élevé que celui induit par l'hypoxie. HIF1 α produit en réponse à l'induction de l'angiotensine II reste dans le noyau des cellules musculaires lisses. Il se lie aux sites HRE et agit sur la transcription (Richard *et al.*, 2000).

Au cours de l'ischémie de la jambe, l'administration systémique de l'angiotensine II, pendant trois à quatre semaines, a permis d'augmenter les index angiographiques de la néovascularisation des tissus ischémiques. Celle-ci est accompagnée d'une augmentation importante de la production de VEGF (Tamarat *et al.*, 2002). L'angiotensine II a également des effets pro-inflammatoires et peut alors modifier le processus de revascularisation.

III. 3) Intérêts de l'angiogenèse thérapeutique

En dépit d'un large arsenal de traitements médicamenteux ou chirurgicaux, un grand nombre de patients atteints d'IC ou d'ischémie critique du membre inférieur se retrouve dans une impasse thérapeutique. Une récente étude a montré que les patients atteints d'une maladie coronarienne ayant une forte collatéralisation ont un risque de mortalité diminué de 36% par rapport à ceux ayant une faible collatéralisation (Meier *et al.*, 2012). Un réseau collatéral bien développé permet de réduire la taille de l'infarctus (Habib *et al.*, 1991), de diminuer les événements cardiovasculaires (Billinger *et al.*, 2002) et de réduire la mortalité pour cause cardiovasculaire (Hansen, 1989). En revanche, une dysfonction ou une raréfaction microvasculaire dans les cœurs ischémiques empêchent une reperfusion efficace du cœur entier (van der Laan *et al.*, 2009) et mènent à la mort des cardiomyocytes et à la dilatation du ventricule gauche entraînant alors l'insuffisance cardiaque (Shiojima *et al.*,

2005). De même, une dysfonction de l'endothélium et une inhibition de la néovascularisation sont les principaux facteurs du développement d'une claudication intermittente et de l'ischémie critique des membres inférieurs menant à la douleur, aux dommages tissulaires et aux ulcérations (Grochot-Przeczek *et al.*, 2013).

C'est en toute logique que de nombreuses équipes de recherche ont basé leurs travaux sur l'angiogenèse thérapeutique, qui a pour but de stimuler le développement de vaisseaux collatéraux. Pour ce faire, les connaissances acquises sur le processus de revascularisation post-ischémique, bien qu'encore incomplètes, ont servi et servent encore à élaborer des approches thérapeutiques en utilisant des facteurs impliqués dans l'angiogenèse et l'artériogenèse parmi ceux cités précédemment. Trois types d'approches sont principalement étudiés : la thérapie basée sur des facteurs de croissance sous forme de protéines recombinantes, la thérapie génique et la thérapie cellulaire.

IV. Biothérapie des pathologies ischémiques

IV. 1) Thérapie basée sur les protéines recombinantes au stade clinique

Parmi les nombreux facteurs exerçant des effets pro-angiogéniques, plusieurs ont prouvé leur capacité à induire la néovascularisation dans des études pré-cliniques que ce soit dans des modèles de pathologies cardiaques ischémiques ou de maladies des artères périphériques. Encouragé par ce succès, un grand nombre d'essais cliniques ont été menés (Giacca et Zacchigna, 2012; Rubanyi, 2013; Silvestre *et al.*, 2013). La première stratégie de revascularisation thérapeutique testée a impliqué l'administration de facteurs de croissance, initialement sous forme de protéines recombinantes puis via des vecteurs plasmidiques ou viraux.

L'administration des protéines recombinantes présente l'avantage d'être relativement simple à produire. Elles sont injectées par voie intramusculaire, par voie intra-artérielle au niveau du site d'occlusion ou de façon systémique, en intraveineux. Etant donné que le temps de demi-vie des protéines est court, les injections ont été testées de plusieurs façons :

- soit par bolus, en injectant la dose en une seule fois,
- soit en répétant les injections,
- soit par administration continue en utilisant une mini-pompe osmotique.

Le premier essai clinique de phase I a vu le jour en 1998. L'injection intramyocardique de FGF1 a permis d'augmenter la densité capillaire à 12 mois. Le suivi à 3 ans a confirmé la sécurité et l'efficacité de FGF1. Même si la mortalité était similaire dans les deux groupes, le réseau capillaire a persisté, et la fraction d'éjection du ventricule gauche s'est améliorée (Pecher et Schumacher, 2000; Schumacher *et al.*, 1998).

De par les diverses actions de VEGFA au cours de la revascularisation, cette protéine a rapidement été utilisée chez l'homme. Même si les résultats préliminaires ont été positifs en terme de bénéfice thérapeutique (Hendel *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2001), des études à plus grande échelle n'ont pas été probantes. En effet, dans l'essai clinique VIVA (Henry *et al.*, 2003), la protéine recombinante VEGFA₁₆₅ a été administrée par voie intracoronaire chez des patients atteints de maladies coronariennes, mais aucun bénéfice n'a été mis en évidence. Ces échecs sont dus en partie au pouvoir limité de ce facteur angiogénique. En effet, bien que VEGF soit spécifique et indispensable pour la formation des vaisseaux sanguins, des

recherches ont montré que sa surexpression n'est pas suffisante, en l'absence d'une cascade de facteurs de croissance, de leurs récepteurs et de signaux intracellulaires. Son induction mène à la formation de vaisseaux immatures et perméables, souvent associée à une réponse inflammatoire (Yancopoulos *et al.*, 2000). De plus, une forte dose de VEGFA peut avoir des effets indésirables tels qu'une hypotension sévère, un risque de cancer ou d'œdème local (Epstein *et al.*, 2001; Simons *et al.*, 2000).

En parallèle, la protéine recombinante de FGF2 a été utilisée dans plusieurs essais cliniques de phase I, que ce soit chez des patients avec une maladie coronarienne, ou chez des patients atteints d'ischémie du membre inférieur (Laham *et al.*, 2000; Laham *et al.*, 1999; Lazarous *et al.*, 2000; Lederman *et al.*, 2002; Ruel *et al.*, 2002; Simons *et al.*, 2002; Udelson *et al.*, 2000; Unger *et al.*, 2000). Malgré des résultats préliminaires très prometteurs, des essais plus larges, avec un contrôle placebo, n'ont pas permis de mettre en évidence un bénéfice thérapeutique dans les pathologies cardiaques. Cependant, l'étude randomisée contre placebo nommée TRAFFIC, qui permettait l'injection de FGF2 recombinant dans 190 patients avec ischémie critique du membre, a rapporté des effets significatifs sur l'index de pression sanguine systolique et la distance de marche (Lederman *et al.*, 2002). Ces résultats ont démontré l'intérêt de la stratégie pro-angiogénique dans cette pathologie. Cependant, aucune étude de suivi n'a été conduite à cause des résultats décevants des autres essais impliquant l'administration de protéines recombinantes dans les pathologies cardiovasculaires, et à cause de risque de cancer ou d'aggravation des plaques d'athérosclérose.

Bien plus tard, l'injection systémique d'apeline-13 chez des patients atteints d'IC, a permis de réduire la pression artérielle moyenne, et l'index de résistance vasculaire périphérique, jusqu'à augmenter la fraction d'éjection lorsque la protéine est injectée pendant 6 heures (G. D. Barnes *et al.*, 2013). Cependant, cette étude n'a été effectuée que sur 12 patients.

Les résultats négatifs de la thérapie pro-angiogénique basée sur les protéines recombinantes découlent de plusieurs raisons. Le temps de demi-vie de la protéine est trop court pour le maintien d'un effet angiogénique et l'absorption de la protéine par voie intracoronaire est insuffisante. De plus, il est difficile avec cette stratégie d'obtenir un gradient de concentration entre la zone à traiter et le reste de l'organisme.

Il est important également de noter que l'injection systémique de facteurs de croissance accroît le risque de cancer et d'aggravation des plaques d'athérosclérose. C'est pour ces raisons que l'on s'est intéressé à des méthodes de transfert de gène pour faciliter la production locale des facteurs, et pour maintenir celle-ci dans le temps.

IV. 2) Les vecteurs de thérapie génique

Contrairement à l'administration de protéines recombinantes, la thérapie génique peut mener à des taux de protéines soutenus entraînant la libération prolongée de facteurs thérapeutiques par les cellules hôtes. Cette approche repose sur l'introduction de gènes ou d'ARN dans les cellules de patients, de façon *ex vivo* ou *in vivo*, dans le but de produire un effet thérapeutique. Plus de 2350 essais cliniques ont vu le jour depuis la fin des années 80 et sont de plus en plus nombreux (163 en 2015 contre 96 en 2000, d'après le site Web Wiley, the Journal of Gene Medicine), ce qui démontre l'intérêt grandissant pour la thérapie génique.

La thérapie génique s'adressait à l'origine aux maladies monogéniques héréditaires pour lesquelles un seul gène est déficient. Cette stratégie consiste à apporter un gène « médicament » dans la cellule pour obtenir l'expression fonctionnelle de la protéine. Cependant, le concept de thérapie génique s'est étendu rapidement à d'autres pathologies polygéniques telles que les cancers, les maladies infectieuses, cardiovasculaires, neurodégénératives ou oculaires. Jusqu'à aujourd'hui, les essais cliniques de thérapie génique concernent principalement les cancers (64,4%) puis les maladies monogéniques (10%). 7,5% des essais ont visé le traitement des pathologies cardiovasculaires (Figure 3).

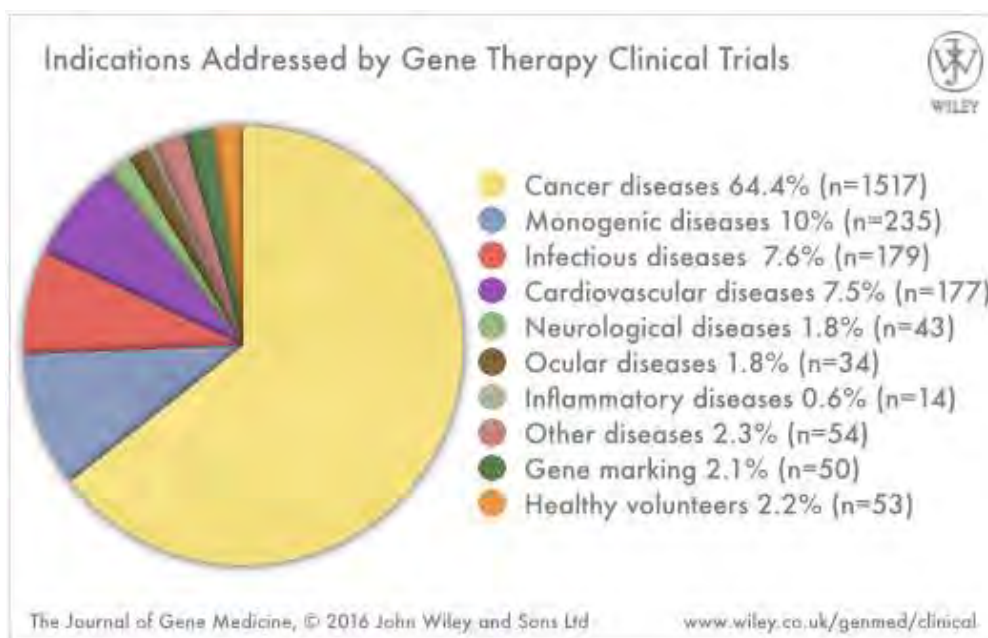


Figure 3 : Indications pour lesquelles sont menés les essais cliniques de thérapie génique.

D'après le site web de Wiley The journal of Gene Medicine :

<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical> (Source 2016).

Au cours des essais de thérapie génique des pathologies cardiovasculaires, différents vecteurs ont été utilisés (d'après le site Web Wiley, the Journal of Gene Medicine) :

- les vecteurs non viraux (plasmides nus n=91 ; lipofection n=5) ;
- les vecteurs viraux tels que les vecteurs adénoviraux (n=59), les virus associés aux adénovirus (n=21), les virus Sendai (n=3), les rétrovirus (n=3) ou encore les lentivecteurs (n=1).

Bien que de nombreux autres vecteurs soient utilisés en clinique ou étudiés en préclinique, seuls les vecteurs cités ci-dessus seront présentés.

IV. 2. a) Les vecteurs non viraux

Pour revues (Rapti *et al.*, 2011; Rincon *et al.*, 2015)

On appelle vecteurs non viraux soit les ADN plasmidiques qui portent le transgène, soit les molécules synthétiques de type liposome par exemple qui permettent d'accroître l'efficacité de transfection. Ces vecteurs appelés aussi vecteurs synthétiques sont utilisés pour la transfection d'ADN plasmidique ainsi que de petites séquences nucléiques comme les oligonucléotides anti-sens, les siRNA (small interfering RNAs), ou les miRNA (micro-RNAs). Des méthodes physiques comme l'électroporation ou la sonoporation sont également utilisées pour améliorer la transfection.

L'ADN nu a été largement utilisé en clinique de part sa simplicité de production, son faible coût et en raison de moindres problèmes de sécurité. En effet, un des avantages majeurs est qu'il est possible de produire de grandes quantités de transgène en utilisant des techniques standards et sans forte augmentation du coût. De plus, l'ADN nu génère une faible réponse immunitaire, ce qui permet de renouveler l'administration. Néanmoins, l'ADN bactérien est connu pour être détecté par le système immunitaire. Des plasmides nommés *mini-circle*, pour lesquels les séquences procaryotes ont été retirées, ont alors été développés (Bigger *et al.*, 2001; Mayrhofer *et al.*, 2009).

Contrairement aux vecteurs viraux, il n'y a aucune limitation de taille, ce qui permet l'utilisation de grandes cassettes d'expression. De plus, l'ADN plasmidique est très stable et peut être conservé pendant de longues périodes sans altérer son intégrité.

Administré par voie intraveineuse, l'ADN ne peut pas traverser la barrière des cellules vasculaires (Ruponen *et al.*, 2005), il subit une dégradation très rapide ce qui fait qu'il est généralement directement injecté dans la zone à traiter du muscle squelettique ou cardiaque.

Le désavantage majeur est sa faible efficacité de transfection et son caractère transitoire puisqu'il ne s'intègre pas dans le génome et qu'il est dégradé par la cellule. Néanmoins, l'expression du transgène dans le muscle a régulièrement été détectée entre 28 et 60 jours après administration sans réplication ni intégration apparente (Wasala *et al.*, 2011).

Malgré les premiers résultats prometteurs, l'approche de thérapie génique via un plasmide nu s'est avérée peu efficace pour traiter les pathologies cardiaques et vasculaires. Différentes stratégies ont alors été développées pour améliorer l'efficacité, telles que la lipofection consistant à créer un complexe liposome-ADN qui fusionne facilement avec la membrane pour insérer le plasmide dans la cellule. Cette technique augmente la stabilité du plasmide mais il est rapidement éliminé par la circulation systémique (Scimia *et al.*, 2013).

D'autres stratégies ont été élaborées dans des modèles animaux, et certains en clinique, tels que l'ADN complexé à des polymères (poly-L-lysine ou polyéthylèneimine), l'électroporation, les nanosphères ou l'UTM (ultrasound-targeted micro-bubbles). Cependant, le transgène ne s'exprime qu'à court terme et de façon relativement peu efficace par rapport aux vecteurs viraux.

IV. 2. b) Les vecteurs viraux

Pour revues (Rapti *et al.*, 2011; Rincon *et al.*, 2015; Warnock *et al.*, 2011)

Le vecteur idéal pour le transfert de gène dans le myocarde ou le muscle squelettique doit pouvoir s'exprimer à un certain haut niveau, sur le long terme, limiter l'expression « off-target » et présenter une faible toxicité et immunogénicité. En règle générale, les vecteurs viraux fournissent une expression du transgène plus élevée que les vecteurs non viraux et ont le potentiel d'une expression à long terme. Les virus dont les vecteurs viraux sont issus, sont des agents infectieux ayant les capacités innées d'envahir efficacement les cellules et d'utiliser la machinerie d'expression génique des cellules hôtes pour se répliquer. Les vecteurs viraux ont été conçus en utilisant cette forte capacité à délivrer et exprimer des gènes thérapeutiques dans les cellules ciblées. Ils ne disposent cependant plus des gènes viraux dans leur squelette, pour supprimer entre autre le caractère infectieux. Les vecteurs viraux sont donc des virus recombinants pour lesquels le génome viral a été remplacé par un génome porteur du gène thérapeutique. Ce matériel génétique (ARN ou ADN) est encapsidé et/ou enveloppé dans une particule virale. La capside faite de protéines et/ou l'enveloppe lipidique interagissent avec des récepteurs de surface cellulaires spécifiques pour aider la liaison, l'internalisation et l'intégration dans la cellule cible.

La production de vecteurs viraux est plus difficile que celle des plasmides. Il est nécessaire d'utiliser des cellules pour les fabriquer ce qui génère des difficultés pour les produire à grande échelle. De plus, les particules virales étant parfois peu stables, la manipulation de ces vecteurs est plus difficile. Selon le type de vecteurs, la réponse immunitaire envers le vecteur ou les cellules modifiées peut être un facteur limitant pour une bonne efficacité du transfert de gène et peut empêcher la réadministration du traitement.

Les différents vecteurs utilisés diffèrent par leur capacité à intégrer le génome de la cellule hôte ou à rester épisomiques, par leur efficacité de transduction selon le type cellulaire, par leur durée d'expression et par la réponse immune ou inflammatoire qu'ils peuvent générer.

Les vecteurs adénoviraux

Les vecteurs adénoviraux (Ad) sont les vecteurs les plus utilisés en clinique, toutes pathologies confondues. Ils ne contiennent pas d'enveloppe mais une capside de forme icosaédrale (20 faces) de 70 à 100 nm de diamètre qui entoure un noyau contenant un ADN. Le génome de l'Ad est double-brin, linéaire et peut contenir une cassette allant jusqu'à 36 kb (contrairement aux Ad de première génération qui ne pouvaient contenir que 7,5 kb d'ADN). Plus de 50 sérotypes humains ont été découverts et sont classifiés dans des groupes de A à F. La transduction des Ad est efficace y compris dans les cellules qui ne sont pas en division telles que les myocytes squelettiques et les cardiomyocytes. Contrairement aux vecteurs non viraux, les Ad rentrent dans la cellule par endocytose. L'Ad de sérotype 5, le plus utilisé, se lie au récepteur cellulaire CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) qui est fortement exprimé par les myocytes et faiblement par les cellules endothéliales et musculaires lisses. L'Ad49, au contraire, montre une meilleure transduction dans les cellules vasculaires (Dakin *et al.*, 2015). Une fois dans le cytoplasme, les vecteurs adénoviraux libèrent leur capside qui est transloquée vers le noyau où les protéines de la capside finissent par se dissocier totalement, ce qui entraîne l'importation de l'ADN viral à travers les pores nucléaires. Les vecteurs Ad ne s'intègrent pas au génome de la cellule, ils restent épisomiques comme les plasmides. Il n'y a donc pas d'intégration aléatoire qui pourrait activer des oncogènes (Figure 4).

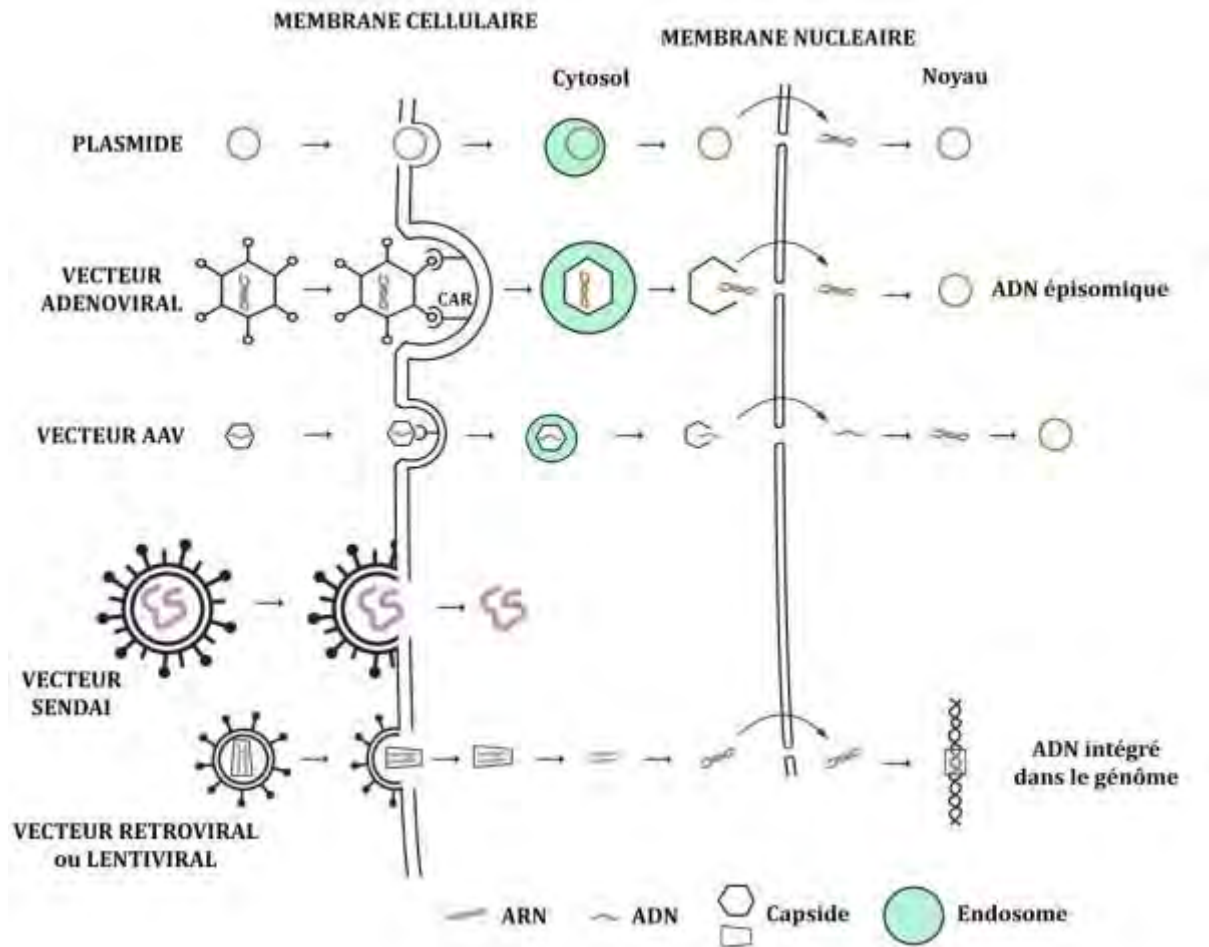


Figure 4 : Biologie des vecteurs utilisés en thérapie génique cardiaque et vasculaire

Les adénovirus qui ont servi de support pour les vecteurs adénoviraux utilisent les fonctions cellulaires pour leur réplication, suivie par l'autolyse de la cellule hôte pour infecter de nouvelles cellules. Il a donc fallu modifier certaines séquences du génome pour pouvoir l'utiliser en tant qu'outil de thérapie génique. Trois générations de vecteurs ont vu le jour. La première a permis de supprimer la capacité répliquative, mais la production de protéines virales toujours possible a engendré une réponse cytotoxique sévère des cellules T. Pour la deuxième génération, les unités de transcription E2, E3 et E4 codant entre autres pour des protéines qui bloquent la réponse naturelle de la cellule à l'infection virale, ou qui permettent la réplication de l'ADN, ont été supprimées. Enfin, la troisième génération dite *gutless* ne contient aucune séquence virale excepté les sites ITR (inverted terminal repeat) et les signaux d'encapsidation. L'absence d'expression de protéines virales permet d'éviter la réactivité des cellules T et la taille du transgène à insérer peut être plus importante.

Bien que les Ad ne peuvent pas traverser la barrière endothéliale facilement après administration systémique, il a été montré qu'ils peuvent transduire sélectivement les

cellules endothéliales après administration locale (Vassalli *et al.*, 2003). De plus, la perfusion coronarienne ou l'injection intramyocardique directe permet d'atteindre de hauts niveaux de transduction du myocarde (Williams *et al.*, 2010).

Les Ad ont beaucoup d'avantages, ce qui leur a permis une telle popularité dans les essais cliniques. En plus de pouvoir transduire des cellules quiescentes ou en division et contenir un large insert, les Ad permettent une expression rapide du transgène (2-3 jours), ne sont pas oncogènes, peuvent être produits à des titres élevés et les vecteurs recombinants sont stables. Ils présentent cependant quelques limitations. Le niveau d'expression ne peut pas être constant, il décline en conséquence d'une forte réponse immunogène, ce qui limite le temps d'expression du vecteur et empêche la réadministration, malgré le développement de la troisième génération. Ils induisent également une réponse inflammatoire.

Les vecteurs adénoviraux ont plus de 500 fois été utilisés en clinique, particulièrement en tant que vaccins ou pour traiter le cancer. Presque tous les essais cliniques ont indiqué que ce vecteur était sûr et bien toléré. Une partie d'entre eux rapporte une certaine efficacité atteignant ainsi les phases 3 ou 4. Néanmoins, l'expression transitoire des Ad limite leur application dans les pathologies ischémiques chroniques mais ils peuvent être utiles, étant donné leur fort pouvoir de transduction, pour les thérapies pro-angiogéniques à court-terme des cardiopathies ischémiques (Kilian *et al.*, 2010) ou l'ischémie du membre inférieur (Muona *et al.*, 2012). Il est cependant important de mettre l'accent sur le développement d'Ad ne générant pas de réponses immunes et inflammatoires.

Les vecteurs AAV (virus associés aux adénovirus)

Les AAV font partie de la famille des *Parvovirus*. Ces virus ne peuvent pas naturellement se répliquer, ils nécessitent l'aide d'un autre virus, tel que l'Ad ou le virus de l'herpès ou encore un stress génotoxique pour se répliquer dans le noyau de la cellule hôte. Les AAV n'ont pas d'enveloppe mais une capside de la même forme icosaédrale que les Ad et ils sont plus petits (22 nm de diamètre) (Figure 4). Même si les AAV peuvent transduire des cellules en division ou non, chaque sérotype de ce virus (13 connus à ce jour avec plus de 100 variants) a sa propre capside caractéristique avec une affinité spéciale pour certains récepteurs de la cellule hôte. Le sérotype est donc choisi en thérapie génique, en fonction du type de tissu ciblé. Le génome de l'AAV sauvage est composé d'ADN linéaire simple-brin avec deux cadres de lecture ouverts flanqués à chaque bout d'une séquence ITR de 145 paires de bases. La partie 5' contient des nucléotides codant pour quatre protéines de réplication (Rep 40, Rep 52, Rep 68 et Rep 78). La partie 3' code pour trois protéines de la capside (VP1, VP2 et VP3). Contrairement à l'AAV sauvage qui est capable de s'intégrer dans le génome humain sur le

chromosome 19, certaines séquences ont été supprimées dans les AAV utilisés comme outils de thérapie génique, les rendant incapables de s'intégrer spécifiquement. Même si les AAV recombinants restent pour la plupart épisomiques, il arrive parfois que certains s'intègrent aléatoirement et provoquent des délétions ou des réarrangements des chromosomes.

L'expression des protéines a lieu plus tardivement qu'avec une transduction adénovirale, mais une fois que l'AAV a atteint son niveau d'expression final, celui-ci persiste plusieurs mois voire plus d'un an pour certains tissus, tels que le cerveau (Paterna et Bueler, 2002), le muscle (Z. Wang *et al.*, 2005) et l'œil (Martin *et al.*, 2002). Jusqu'à maintenant, l'AAV n'est pas associé à des pathologies humaines, ce qui le rend très intéressant pour la thérapie génique. De plus, la réponse inflammatoire qu'il génère est faible. Cependant la taille du transgène est limitée à 4,5 kb ce qui rend impossible le transfert de gène codant pour de larges protéines. Pour pallier à ce problème, des stratégies de vecteur-double se développent. Le principe fondamental est de séparer le génome du vecteur en deux virions indépendants. La reconstitution fonctionnelle de la cassette d'expression s'appuie ensuite sur la concatémérisation du génome de l'AAV et/ou sur la recombinaison homologue *in situ* dans les cellules transduites. Cette approche a permis de transduire des cœurs de souris atteintes de dystrophie musculaire de Duchenne aussi efficacement que l'AAV conventionnel (Ghosh *et al.*, 2009).

Cependant, même si l'AAV possède un grand nombre d'avantages pour certaines pathologies, comparé aux autres vecteurs, un problème de taille se pose puisque 40 à 70% de la population est porteuse d'anticorps anti-AAV neutralisants, selon la zone géographique (Greenberg *et al.*, 2016). Ces anticorps sont dirigés contre la capsid, pour la plupart celle de l'AAV2 qui est d'ailleurs le sérotype le plus utilisé dans les essais cliniques, et cela affecte l'expression génique. De plus, l'administration d'AAV chez les patients n'ayant jamais été exposés à l'AAV sauvage, mène au développement d'anticorps ce qui rend impossible une seconde application. Un autre obstacle à l'utilisation des AAV est la réponse immunitaire envers le transgène, ce qui empêche également une expression efficace du gène thérapeutique. La réponse immunitaire a été observée dans un essai clinique après injection intramusculaire de l'AAV1 (Mingozzi *et al.*, 2009) et chez le chien atteint de dystrophie musculaire (Z. Wang *et al.*, 2007).

En ce qui concerne la thérapie génique pour les pathologies cardiaques, il a été difficile d'atteindre une importante efficacité de transduction dans les cardiomyocytes après injection intramyocardique ou intracoronaire. Des analyses ont montré que les sérotypes 1, 6, 8 et 9 offrent un fort tropisme pour le myocarde, et plus particulièrement le 6 et le 9, après injection systémique (Inagaki *et al.*, 2006; Pacak *et al.*, 2006; Zincarelli *et al.*, 2010).

L'association des séquences ITR du sérotype 2 avec la capsid du sérotype 9 (noté rAAV 2/9) a permis d'augmenter de 200 fois la transduction des cardiomyocytes en comparaison avec l'AAV 2/1 (Pacak *et al.*, 2006).

Il faut savoir que certains sérotypes d'AAV sont capables de transcytose à travers la barrière épithéliale et de l'endothélium (Di Pasquale et Chiorini, 2006). Comme l'injection intraveineuse est peu invasive (comparé par exemple à la perfusion dans l'artère coronaire ou à l'injection intramyocardique), et que la transduction dans le muscle se restreint parfois au site d'injection, il est intéressant d'utiliser la capacité de certains sérotypes à transduire un tissu après injection systémique. Cependant, cette technique génère un risque de transduction de tissus non ciblés, malgré le tropisme des AAV. Pour contourner ce problème, il est possible d'utiliser des promoteurs spécifiques du tissu ciblé, mais ils sont généralement plus longs ce qui restreint la taille du gène thérapeutique et l'expression est parfois plus faible que celle obtenue avec le promoteur CMV (cytomégalovirus). Une approche alternative consiste à incorporer une cassette miRNA qui réprime l'expression du gène thérapeutique dans les cellules non ciblées (Geisler *et al.*, 2011; Geisler *et al.*, 2013).

Plusieurs études sont réalisées, à l'heure actuelle, pour créer un AAV avec un tropisme plus important pour le tissu ciblé, tout en augmentant sa spécificité, et en étant capable d'échapper aux anticorps neutralisants (Louis Jeune *et al.*, 2013).

En clinique, l'AAV a principalement été utilisé pour les pathologies monogéniques ou le cancer, mais il a servi également dans la thérapie génique de d'autres maladies, telles que la maladie de Canavan, de Parkinson ou encore la déficience en α -antitrypsine. De plus, étant donné que ce vecteur a le potentiel de transduire les cellules en division (comme les myoblastes) et les cellules quiescentes comme les myotubes et les cardiomyocytes, il est employé dans des pathologies qui affectent le muscle squelettique et le myocarde.

Les vecteurs du virus Sendai

Les virus Sendai (SeV) font partie de la famille des *Paramixovirus*. Ce sont des virus à ARN simple-brin avec une large forme sphérique (260 nm de diamètre en moyenne). Le virion consiste en une nucléocapside, une enveloppe et une matrice connectant les deux (Figure 4). Le SeV a été utilisé en recherche, entre autres, comme outil pour délivrer des macromolécules (protéines ou acides nucléiques) dans des cellules de mammifères à travers la fusion de la membrane. Il n'est ni tumorigène, ni pathogène pour l'homme. Il permet une transduction transitoire mais efficace et peu spécifique par rapport aux espèces, ou aux types cellulaires. Sa production se fait à partir d'œuf de poulet fécondé, et il est très facile

d'obtenir de grandes quantités puisque l'on peut obtenir 1 mg à partir d'un seul œuf ((Nakanishi et Otsu, 2012).

L'utilisation du SeV en médecine moléculaire est dépendante de sa forte mais transitoire expression du gène thérapeutique, de sa large spécificité pour les cellules de l'hôte, de sa faible pathogénicité et de sa forte immunogénicité. Jusqu'à maintenant, la faisabilité d'utiliser ce vecteur en clinique a essentiellement été analysée pour des vaccins vivants atténués, pour la thérapie génique de l'ischémie du membre et du cancer. Seuls trois essais cliniques ont été initiés dans l'ischémie critique du membre ou la claudication intermittente, au Japon et aux Etats-Unis. Le SeV est également étudié sur des souris comme plateforme pour un vaccin contre le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et contre le virus influenza (Le *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2008).

Les vecteur rétroviraux

Pour revues (Warnock *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2011)

Les rétrovirus sont connus pour leur capacité à transcrire inversement leur génome sous forme d'ARN simple brin, en un ADN double-brin pour se répliquer dans la cellule infectée. Deux catégories de rétrovirus se distinguent : les virus simples (rétrovirus oncogènes) ou les virus complexes (lentivirus et spumavirus). Cette partie décrira essentiellement les rétrovirus simples.

Leur capsid est entourée d'une enveloppe d'environ 80-100 nm de diamètre qui contient des glycoprotéines de surface et transmembranaires pour permettre l'adhérence à la membrane cellulaire. Le génome des rétrovirus est linéaire, non-segmenté, de 7 à 12 kb de long. Il contient trois gènes, *gag*, *pol* et *env*, qui codent respectivement pour les protéines de la capsid, pour la transcriptase inverse et l'intégrase, et pour les composants de surface et transmembranaires de l'enveloppe virale. Un petit domaine contient le gène *pro* qui code pour la protéase virale.

Le cycle de vie du rétrovirus débute lorsque les glycoprotéines de l'enveloppe s'attachent aux récepteurs spécifiques de la cellule hôte. L'enveloppe virale fusionne avec la membrane et libère la capsid dans le cytoplasme. Les protéines codées par le gène *pol* servent alors à la rétrotranscription de l'ARN en ADN. Comme l'ADN double brin ne peut traverser la membrane nucléaire des cellules qui ne sont pas en division, l'intégration du virus est seulement possible à un certain moment du cycle de la cellule. Par la suite, l'intégrase permet à l'ADN viral de s'intégrer au génome de la cellule hôte (Figure 4). Pour se répliquer, l'ARN polymérase II transcrit la séquence virale en ARN messenger qui code pour des

protéines virales. Après l'assemblage du virus dans le cytoplasme, il sort de la cellule par bourgeonnement au niveau de la membrane cellulaire, où la capside reçoit son enveloppe.

Les vecteurs rétroviraux ne doivent pas avoir la capacité de se répliquer. Pour cela, les éléments *gag*, *pol* et *env* ont été retirés, ne laissant que les sites d'attachement, les séquences LTR (long terminal repeat), les signaux d'encapsulation et les sites importants pour l'expression du gène viral. La suppression de certaines séquences fournit la place pour le gène d'intérêt. Pour produire ces vecteurs, il est nécessaire d'avoir recourt à des cellules qui sont transfectées avec des plasmides contenant les trois éléments supprimés. Pour améliorer la sécurité, *gag* et *pol* sont contenus dans un plasmide et *env* dans un autre. Le transgène est contenu dans un troisième plasmide.

Les vecteurs rétroviraux sont les premiers vecteurs à avoir été conçus (Mann *et al.*, 1983) et à avoir été utilisés en clinique. En 1990, une petite fille atteinte d'un déficit en adénosine désaminase (ADA), a reçu une greffe de lymphocytes T dans lesquels le gène de l'ADA a été introduit à partir d'un vecteur rétroviral dérivé du virus de la leucémie murine (MLV) (Blaese *et al.*, 1995). Les vecteurs rétroviraux ont été les systèmes de transfert de gènes les plus appréciés pour les essais cliniques de thérapie génique grâce à leur capacité à transduire les cellules en division sans produire de protéines virales immunogènes tout en permettant l'expression permanente du transgène. Ces vecteurs sont néanmoins limités par leur relativement petite capacité de transport et par leur incapacité à intégrer des cellules quiescentes. De plus, l'intégration dans le génome n'est pas sans risque, et c'est ce que l'on a pu réaliser avec l'essai clinique sur l'immunodéficience combinée sévère liée au chromosome X (X-SCID). Les enfants ont été traités avec des cellules hématopoïétiques autologues transduites *ex vivo* avec un rétrovirus exprimant le gène *IL2RG*. Des améliorations dans la fonction des cellules T ont été observées et l'essai a été considéré comme un succès pour la thérapie génique. Malheureusement, 5 enfants sur 20 ont développé une leucémie suite à l'activation de proto-oncogène cellulaire. Quatre des cinq enfants ont survécu, après chimiothérapie mais l'essai a été interrompu. Cependant, le même système de transfert de gène a été utilisé pour des patients atteints de déficience ADA avec succès et aucun n'a développé de leucémie. Ces études suggèrent fortement que le développement d'une leucémie par l'intégration du vecteur rétroviral dépend de facteurs associés à la pathologie (Fischer *et al.*, 2011).

L'incorporation stable de l'ADN viral dans le génome de l'hôte est un avantage pour une expression du transgène à long terme mais l'intégration non spécifique peut soit causer une rupture d'un gène au niveau du site d'incorporation soit causer une expression anormale des gènes voisins par la séquence activatrice de l'ADN viral inséré. L'activation de gènes

impliqués dans des fonctions critiques de la cellule telles que la progression du cycle cellulaire, peut devenir une cause majeure de transformation de la cellule et d'oncogenèse, et particulièrement en présence de perturbations physiologiques ou génétiques. En plus du risque de mutagenèse insertionnelle, des rétrovirus pouvant se répliquer (RCR : replication competent retroviruses) peuvent être générés. Des efforts ont alors été faits pour développer des générations de vecteurs plus sûres. Les vecteurs SIN (self-inactivating) pour lesquels le promoteur viral a été supprimé, ont été proposés, tout d'abord avec des vecteurs viraux MLV. Les recherches se sont également focalisées sur les lentivirus, car les vecteurs lentiviraux peuvent présenter une sécurité supplémentaire puisqu'il ne s'intègre que dans les gènes et non en amont de sites d'initiation de la transcription (Fischer *et al.*, 2011).

Les lentivecteurs

Pour revues (Escors et Breckpot, 2010; Giry-Laterriere *et al.*, 2011)

Les lentivirus sont une sous-catégorie de la famille des rétrovirus. Le lentivirus le plus commun est le VIH de type 1. Comme les rétrovirus simples, ils possèdent une capsid et une enveloppe contenant un génome sous forme d'ARN simple brin de 7 à 12 kb. Cependant, en plus des gènes *gag*, *pol*, *env*, le génome comprend six autres gènes, deux gènes régulateurs et quatre gènes accessoires, qui codent pour des protéines importantes pour la réplication virale, la liaison, l'infection et le relargage :

rev : permet l'export du transcrit viral du noyau vers le cytoplasme ;

tat : est nécessaire à la réplication du lentivirus, augmente de 1000 fois la transcription ;

nef : perturbe l'activation des cellules T et stimule le caractère infectieux ;

vpr : permet au virus d'infecter des cellules quiescentes ;

vpu : améliore le relargage du virus de la membrane cellulaire vers le cytoplasme ;

vif : est nécessaire à la réplication du lentivirus.

Le cycle de vie du lentivirus est similaire à celui des autres membres de la famille (Figure 4). On distingue cependant deux phases d'expression génique, connue comme la phase précoce et la phase tardive qui sont séparées par la liaison de la protéine Rev. Les lentivirus sont, de plus, capables d'infecter des cellules qui ne sont pas en division grâce aux protéines exprimées par le gène *vpr*. Enfin, le gène *tat* que l'on retrouve uniquement dans les rétrovirus complexes est essentiel à la réplication du lentivirus.

Le lentivecteur le plus commun dérive du VIH-1. Il peut contenir une cassette allant jusqu'à 10kb. Il ne transfère pas les séquences qui codent pour les protéines virales ce qui minimise

le risque que les cellules transduites soient attaquées par les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus.

La protéine Env qui permet l'entrée des particules virales dans la cellule cible est dirigée, pour le VIH-1, contre le CD4 présent à la surface des cellules T, macrophages et quelques cellules gliales. Cependant, comme pour les rétrovirus, il est possible de substituer cette protéine par celle correspondant à un autre virus. Ce processus qui altère le tropisme du virion s'appelle pseudotypage. L'enveloppe du VSV-G (vesicular stomatitis virus) est souvent utilisée pour les lentivecteurs mais aussi pour les oncorétrovirus, parce qu'elle est très stable, qu'elle permet de concentrer le lentivecteur par ultracentrifugation et parce que le récepteur qu'elle reconnaît est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules de mammifères. Ces lentivecteurs pseudotypés avec l'enveloppe du VSV-G possèdent généralement les titres les plus élevés, les particules les plus robustes et le tropisme le plus large. Ils sont pour ces raisons les plus utilisés en recherche préclinique et clinique. Cependant, d'autres enveloppes sont utilisées pour un tropisme plus spécifique d'un type cellulaire (Giry-Laterrière *et al.*, 2011). Des études ont récemment démontré, par exemple, que le lentivecteur pseudotypé avec l'enveloppe du rétrovirus de babouin était plus efficace pour transduire les CSH que celui avec le VSV-G (Girard-Gagnepain *et al.*, 2014). De même, l'enveloppe du virus de la rougeole permet une transduction efficace des cellules T, B et dendritiques (Frecha *et al.*, 2009; Frecha *et al.*, 2008; Humbert *et al.*, 2012). Au même titre que les autres vecteurs, la sécurité du transfert de gène peut être améliorée avec des promoteurs spécifiques ou inductibles pour que le transgène soit exprimé uniquement dans les cellules désirées. Dans le cœur, Lee et coll. démontrent la tissu-spécificité du promoteur α -MHC réduit à une taille de 1,2kb et suggère la possibilité d'augmenter l'expression du transgène dans le cœur en insérant en plus de ce promoteur la séquence activatrice du promoteur CMV (C. J. Lee *et al.*, 2011), comme cela a été réalisé avec succès pour d'autres promoteurs (Gruh *et al.*, 2008).

Pour produire des vecteurs de thérapie génique, il est important d'éviter l'émergence de particules infectieuses. Dans le génome rétroviral ou lentiviral, toutes les séquences codantes sont situées sur une seule molécule d'ARN. Pour la sécurité du système, les gènes cités précédemment, dont l'expression est indispensable à la production d'une particule virale recombinante, sont exprimés à partir de trois ou quatre plasmides différents. Ainsi le risque de produire des particules virales infectieuses est infime, car un nombre de recombinaisons important serait nécessaire pour pouvoir recréer un virus répliquatif. D'ailleurs à ce jour il n'a jamais été identifié de particule rétrovirale ou lentivirale répliquative dans les productions de vecteurs, c'est pourquoi les productions de ces vecteurs ont été

déclassées de L3 en L2 en terme de niveau de confinement, et ce, quelle que soit le gène d'intérêt inséré dans le vecteur.

La première génération de lentivecteur contient tous les gènes cités précédemment à l'exception de l'enveloppe. Cependant, cinq autres gènes (*env*, *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*) peuvent être supprimés sans altérer les capacités de transfert de gène. Dans cette seconde génération, le plasmide d'empaquetage R8.91 ne contient que les protéines structurales et régulatrices du VIH-1. Le plasmide pSIN a, lui, subi une suppression *self-inactivating* (SIN) dans la séquence U3 du 3'LTR (long terminal repeat). Les vecteurs SIN, comme il a été dit plus haut, sont incapables de reconstituer leur promoteur viral et sont donc plus sûrs. Aucune particule infectieuse n'a été détectée après utilisation de cette génération de lentivecteurs, mais la sécurité a encore été renforcée par une troisième génération consistant à séparer les gènes *rev* des autres gènes et à remplacer le promoteur U3 par un promoteur constitutif fort indépendant de *tat*, comme celui du CMV. Dans la dernière génération, quelques améliorations ont été introduites. Le WPRE (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) a été ajouté pour améliorer le niveau de transcrits dans les cellules permettant la production mais également dans les cellules cibles, ce qui a permis d'augmenter les titres et l'expression du transgène. Enfin, le développement de lentivecteur non intégratif (NILV) a attiré beaucoup d'attention. Des mutations ont été effectuées dans la région codant pour l'intégrase, ce qui élimine son activité sans affecter la transcription inverse et le transport de l'ADN dans le noyau. Ainsi, l'ADN du lentivecteur reste épisomique dans le noyau, et mène à une expression soutenue dans les cellules post-mitotiques comme dans la rétine, le cerveau et le muscle (Apolonia *et al.*, 2007; Philippe *et al.*, 2006; Yanez-Munoz *et al.*, 2006). Ils peuvent également être utiles dans les pathologies qui ne nécessitent pas d'expression persistante, comme la vaccination.

Les lentivecteurs ont été utilisés dans des études sur le système nerveux et cardiaque. Des résultats prometteurs ont été obtenus avec ce type de vecteur dans un traitement anti-VIH, pour soigner l'adrénoleucodystrophie, la maladie de Parkinson, la β -thalassémie ou le cancer.

Les lentivecteurs pour un transfert de gène dans le cœur et le muscle squelettique

Des études *in vitro* ont mis en évidence une forte efficacité de transduction des cardiomyocytes par les lentivecteurs : 70% des cardiomyocytes adultes et 100% des cardiomyocytes néonataux en culture (J. Zhao *et al.*, 2002). *In vivo*, les lentivecteurs permettent de transduire et d'exprimer des gènes sur une longue période dans les

cardiomyocytes après injection intramyocardique (Fleury *et al.*, 2003; J. Zhao *et al.*, 2002). Un pic d'expression est observé entre 3 et 7 jours après injection, le niveau décline un peu mais est persistant jusqu'à plus de 10 semaines. Niwano et coll. ont montré qu'en insuffisance cardiaque, l'injection intracoronaire hypothermique de lentivecteurs permet de transduire jusqu'à 40% du cœur, après 3 semaines (Niwano *et al.*, 2008). Ces résultats sont très intéressants puisque cela permettrait d'exprimer à long terme un gène thérapeutique en évitant le besoin de réadministration, les effets néfastes des vecteurs Ad et les problèmes de capacité et d'anticorps neutralisants liés aux AAV.

Récemment, une étude a comparé le transfert de gène dans le cœur de souris par le vecteur adénoviral, l'AAV et le lentivecteur (Merentie *et al.*, 2016). Les vecteurs ont été délivrés dans le myocarde sous échocardiographie. L'Ad permet la plus forte efficacité de transduction dans les cardiomyocytes (40%), suivi par l'AAV2 et AAV9 (20%), et la plus faible efficacité est observée avec le lentivecteur (10%). Il faut cependant noter que dans cette étude, la dose virale avec le lentivecteur était inférieure comparé aux autres vecteurs, de part la difficulté à obtenir des titres élevés avec le lentivecteur, et que le promoteur utilisé était le promoteur PGK (phosphoglycerate kinase-1). On pourrait s'attendre à une meilleure efficacité avec le promoteur CMV et avec un titre plus élevé, comme cela a été observé dans des études précédentes (Niwano *et al.*, 2008; J. Zhao *et al.*, 2002). Il a de plus été rapporté dans l'étude de Merentie et coll. que le développement de l'inflammation et de la fibrose locales est proportionnel à l'efficacité de transduction. L'Ad cause également une dilatation et une dysfonction systolique et l'AAV9 est responsable d'une dysfonction diastolique. Seuls le lentivecteur et l'AAV2 n'affectent pas la fonction cardiaque. Au vu de ces résultats, les auteurs concluent cet article en encourageant le développement des études sur le potentiel du lentivecteur pour la thérapie génique cardiaque.

En ce qui concerne la thérapie génique des pathologies des membres inférieurs, les lentivecteurs sont également capables de transduire les myocytes, les cellules endothéliales ou les progéniteurs endothéliaux. Ils sont alors tout aussi intéressants pour traiter les maladies vasculaires périphériques, et/ou induire une vasculogénèse et une angiogénèse thérapeutiques (Pichavant et Tremblay, 2012; Vandendriessche et Chuah, 2013).

IV. 3) Thérapie génique des pathologies ischémiques

Plusieurs types de facteurs angiogéniques et/ou cardioprotecteurs qui présentent des propriétés différentes ont été explorés par thérapie génique dans les maladies cardiovasculaires.

Parmi eux, le VEGF₁₆₅ a été surexprimé dans le myocarde de petits ou grands animaux par transfection de plasmide ou transduction de vecteur adénoviral ou d'AAV. Dans des modèles de cardiopathies ischémiques, ce transfert de gène est capable d'induire l'angiogenèse en améliorant le flux sanguin et la fonction du ventricule gauche (Rincon *et al.*, 2015). En effet, le plasmide exprimant VEGFA₁₆₅ injecté dans un modèle d'occlusion de l'artère coronaire chez le mouton permet de réduire de 30% la taille de l'infarctus et d'améliorer la perfusion myocardique et la fonction cardiaque (Vera Janavel *et al.*, 2012). Un AAV exprimant ce même gène, injecté chez le porc après occlusion d'une branche de l'artère coronaire gauche, améliore la viabilité du tissu et stimule l'artériogenèse mais n'augmente pas significativement la fraction d'éjection (Ferrarini *et al.*, 2006). VEGF joue également un rôle dans le maintien de l'homéostasie physiologique dans le cœur (Giacca et Zacchigna, 2012). Plusieurs études cliniques de phase I ont évalué l'administration d'un plasmide exprimant VEGFA₁₆₅ (Losordo *et al.*, 1998; Symes, 2001; Vale *et al.*, 2001). Les résultats ont été prometteurs et suggèrent que le plasmide est efficace pour stimuler la vascularisation. Par la suite, cinq essais cliniques plus importants ont été réalisés avec l'injection d'un plasmide ou d'un vecteur adénoviral exprimant VEGFA₁₆₅ (Favaloro *et al.*, 2013; Hedman *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2003; Kastrup *et al.*, 2005; D. J. Stewart *et al.*, 2009). Aucun effet indésirable n'a été observé, mais ils n'ont pas permis de mettre en évidence une amélioration de la perfusion ou du mouvement de la paroi ventriculaire. Une amélioration de la classe et de la fréquence des angines a cependant été détectée dans l'essai VIVA. VEGFA₁₂₁ surexprimé à l'aide d'un vecteur adénoviral n'a pas non plus permis d'améliorer la perfusion myocardique (Kastrup *et al.*, 2011; D. J. Stewart *et al.*, 2006). En parallèle, les premiers résultats d'essais cliniques de phase I ou II évaluant les effets de l'administration de VEGFA₁₆₅ sous forme de plasmide ou de VEGFA₁₂₁ par un vecteur adénoviral, chez des patients atteints d'ischémie critique du membre inférieur, se sont avérés prometteurs (Baumgartner *et al.*, 1998; Isner *et al.*, 1996; Kusumanto *et al.*, 2006; Rajagopalan *et al.*, 2003). Cependant, au même titre que les essais sur les pathologies cardiaques, des essais cliniques incluant un nombre plus importants de patients, randomisés, avec un contrôle placebo, ont donné des résultats négatifs.

Avant d'être utilisé dans des essais cliniques, le vecteur adénoviral permettant l'expression du facteur de croissance FGF4 a été injecté chez le porc. Il est responsable d'une amélioration de la fonction ventriculaire régionale et de la fonction myocardique (Gao *et al.*, 2004). Il a également été utilisé en clinique (AGENT), en phase I, II, III et IV. Bien que les premières phases aient permis d'identifier des effets anti-ischémiques favorables, et une tendance à l'amélioration de la perfusion myocardique, sans effets indésirables, il n'y a pas eu de différence significative entre les groupes traités et le groupe placebo (Grines *et al.*, 2002; Grines *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2007). Un essai clinique de phase III a cependant été lancé récemment en Russie avec le vecteur adénoviral exprimant FGF4 et est en cours de recrutement (Kaski et Consuegra-Sanchez, 2013).

L'essai clinique TALISMAN (therapeutic angiogenesis leg ischemia study for the management of arteriopathy and non healing ulcers) est une des études les plus avancées (J. Belch *et al.*, 2011; Comerota *et al.*, 2002; Niebuhr *et al.*, 2012; Nikol *et al.*, 2008). Il avait pour but d'étudier l'efficacité de la thérapie génique à l'aide d'un plasmide exprimant FGF1 chez des patients atteints d'ischémie critique de la jambe, pour lesquels la revascularisation n'était pas possible. La phase II, malgré l'absence d'effet sur la guérison de l'ulcère, a démontré une diminution significative de l'amputation à un an, et une tendance favorable concernant la mortalité. Une phase III (TAMARIS) a alors été initiée. Malheureusement, les résultats de cette phase n'ont pas confirmé les précédents, malgré un protocole identique (J. Belch *et al.*, 2011).

D'autres études précliniques et cliniques ont été réalisées ou sont en cours, avec HGF, SDF1 et HIF1 α , ou des facteurs agissant sur le transport du calcium et la contractilité (S100A1, β -adrenergic receptor, adenylyl-cyclase 6) avec des résultats parfois encourageants (Rincon *et al.*, 2015; Silvestre *et al.*, 2013). Cependant, les différences entre les résultats des essais de phases I/II et ceux de phase IIb ou plus soulignent le besoin de réaliser des études sur un grand nombre de patients avec un contrôle placebo.

Les facteurs que nous avons sélectionnés, au cours de ma thèse, pour traiter l'insuffisance cardiaque ou l'ischémie du membre inférieur, ont déjà été utilisés en thérapie génique dans les maladies cardiovasculaires. Les résultats des études sur SERCA2a, apeline, FGF2 et Cyr61 sont détaillés ci-dessous.

IV. 3. a) Utilisation de SERCA2a en thérapie génique cardiaque

Le transfert du gène SERCA2a par un vecteur adénoviral permet d'augmenter le transport du calcium et d'améliorer la contraction de cardiomyocytes isolés de rat (Giordano *et al.*, 1997; Hajjar *et al.*, 1997). Ce même vecteur est capable d'augmenter l'activité de la pompe et la vitesse de contraction et relaxation de cardiomyocytes issus de cœurs humains en insuffisance (del Monte *et al.*, 1999) et de restaurer la fonction cardiaque dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat (del Monte *et al.*, 2001; Miyamoto *et al.*, 2000). Un lentivecteur exprimant SERCA2a a également été injecté et le gène, intégré avec succès, induit un remodelage moléculaire favorable, prévient le remodelage géométrique du ventricule gauche et améliore le taux de survie (Niwano *et al.*, 2008). Plusieurs études ont mis en évidence également une diminution des arythmies ventriculaires après surexpression de SERCA2a avec un vecteur adénoviral ou un AAV9 (del Monte *et al.*, 2004; del Monte *et al.*, 2001; Lyon *et al.*, 2011; Prunier *et al.*, 2008) (Tableau 2).

De plus, contrairement aux agents inotropes qui améliorent la fonction contractile aux dépens de l'augmentation de la mortalité et de l'aggravation du métabolisme, le vecteur adénoviral porteur de SERCA2a a un effet bénéfique sur la survie et le potentiel énergétique chez le rat (del Monte *et al.*, 2001). En effet, ajoutée à son action sur la contractilité, la surexpression de SERCA2a dans différents modèles animaux d'IC met en évidence une amélioration du métabolisme cardiaque et de l'utilisation de l'énergie. Cette restauration est importante puisque l'augmentation de la contractilité du myocarde est associée à une plus forte demande en énergie (Sakata *et al.*, 2007) (Tableau 2).

Des études précliniques ont été effectuées chez le porc, le mouton et le chien pour évaluer l'efficacité de la surexpression de SERCA2a. Parmi ces différents essais, on observe que la fraction d'éjection est fortement augmentée dans le groupe traité, les volumes ventriculaires sont restaurés, le flux sanguin coronarien est augmenté, l'expression du BNP est réduite et aucun effet secondaire n'a été mis en évidence (Beeri *et al.*, 2010; Byrne *et al.*, 2008; Kawase *et al.*, 2008; Mariani *et al.*, 2011; Mi *et al.*, 2009; Prunier *et al.*, 2008) (Tableau 2).

Tableau 2 : Etudes précliniques de thérapie génique avec le gène SERCA2a

Vecteur	Modèle	Espèce	Résultats	Référence
Ad	Cardiomyocytes néonataux	Cellules de rat	restauration des niveaux de SERCA2a restauration du transport du calcium	(Giordano <i>et al.</i> , 1997)
Ad	Cardiomyocytes néonataux	Cellules de rat	augmentation du transport du calcium amélioration de la contraction	(Hajjar <i>et al.</i> , 1997)
Ad	Cardiomyocytes de cœur humain en IC	Cellules humaines	restauration de la fonction contractile	(del Monte <i>et al.</i> , 1999)
Ad	Banding aortique vers l'IC	Rat	amélioration de la fonction cardiaque	(Miyamoto <i>et al.</i> , 2000)
Ad	IC après banding aortique	Rat	restauration de la fonction énergétique diminution des arythmies ventriculaires amélioration de la survie	(del Monte <i>et al.</i> , 2001)
Ad	Ischémie-reperfusion	Rat	restauration de la fonction cardiaque diminution des arythmies ventriculaires	(del Monte <i>et al.</i> , 2004)
Ad	Diabète de type 2	Rat	augmentation du flux sanguin coronarien diminution de l'hypertrophie des cardiomyocytes augmentation de la fonction énergétique	(Sakata <i>et al.</i> , 2007)
Lenti-vecteur	IC après infarctus du myocarde	Rat	diminution du remodelage géométrique amélioration de la survie	(Niawano <i>et al.</i> , 2008)
AAV9	IC après infarctus du myocarde	Rat	diminution des arythmies ventriculaires	(Lyon <i>et al.</i> , 2011)
Ad	Ischémie-reperfusion	Porc	diminution des arythmies ventriculaires	(Prunier <i>et al.</i> , 2008)
AAV1	IC après surcharge de volume	Porc	restauration de la fonction cardiaque amélioration du remodelage ventriculaire	(Kawase <i>et al.</i> , 2008)
AAV1	IC après surcharge de volume	Porc	augmentation du flux sanguin coronarien augmentation de l'expression d'eNOS dans les cellules endothéliales de l'artère coronaire	(Hadri <i>et al.</i> , 2010)
AAV1	IC après forte stimulation avec un pacemaker	Chien	amélioration de la fonction cardiaque	(Mi <i>et al.</i> , 2009)
AAV2/1	IC après forte stimulation avec un pacemaker	Mouton	augmentation de la fraction d'éjection restauration des volumes ventriculaires diminution du BNP	(Byrne <i>et al.</i> , 2008) (Mariani <i>et al.</i> , 2011)
AAV6	IC après infarctus du myocarde	Mouton	amélioration de la fonction cardiaque et de la contractilité diminution de la dilatation	(Beeri <i>et al.</i> , 2010)

Ces résultats ont permis l'élaboration d'un essai clinique de phase 1/2 (Hajjar *et al.*, 2008; Jaski *et al.*, 2009) mettant en évidence la sécurité et la faisabilité de cette thérapie génique chez des patients en insuffisance cardiaque avancée. La phase 2 nommée CUPID (Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease) a mis en évidence, avec la forte dose, une amélioration des symptômes des patients et de la capacité fonctionnelle et une réduction des événements et des temps d'hospitalisation (Jessup *et al.*,

2011). Ces bénéfices ont perduré 3 ans après l'unique injection d'AAV1-SERCA2a par voie intracoronaire (Zsebo *et al.*, 2014). Cependant, la phase clinique 2b (CUPID2), à plus grande échelle, n'a pas permis de confirmer ces résultats pourtant très prometteurs (Greenberg *et al.*, 2016). Plusieurs raisons de cet échec sont à l'heure actuelle envisagées, telles qu'une transduction trop faible due à l'injection intracoronaire, le vecteur ne passant pas efficacement de l'endothélium au myocarde, des patients trop sévèrement atteints ou encore la présence d'anticorps neutralisant l'AAV (Greenberg *et al.*, 2016; Yla-Herttuala, 2015).

De façon intéressante, cependant, la phase clinique 2a a suggéré un rôle de SERCA2a dans les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires lisses vasculaires. En effet, des changements dans la contractilité intrinsèque des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi qu'une réduction de la réponse vasodilatatrice dans les vaisseaux toniques contractiles ont été observés dans l'insuffisance cardiaque. Des études ont montré que ces dysfonctionnements vasculaires pouvaient être corrigée par le transfert du gène SERCA2a, ouvrant alors une nouvelle perspective en permettant la transduction de ces deux types cellulaires au même titre que les cardiomyocytes (Lipskaia *et al.*, 2013). Cependant, il faudrait envisager l'utilisation d'un autre type de vecteur qui serait, contrairement à l'AAV1, intégratif. En effet, selon l'équipe de Lipskaia, l'effet bénéfique transitoire des faibles et moyennes doses d'AAV1-SERCA2a en phase 2a pourrait être expliqué par la transduction des cellules endothéliales coronariennes qui améliorerait le flux sanguin. Le cycle de vie de ces cellules étant rapide, les bénéfices s'estomperaient avec la perte de la surexpression de SERCA2a en quelques mois.

IV. 3. b) Utilisation d'apeline en thérapie génique

L'apeline est un candidat émergent dans le domaine de la thérapie génique. A ce jour, seul un groupe a utilisé un vecteur adénoviral pour surexprimer ce gène dans un modèle murin de cardiomyopathie diabétique (H. Zeng *et al.*, 2014). Il démontre que l'apeline augmente la densité vasculaire myocardique, améliore la fonction cardiaque, diminue la formation de ROS (espèces oxygénées réactives) et l'apoptose des cellules endothéliales.

Les traitements avec la protéine recombinante ont cependant mis en évidence de multiples fonctions cardioprotectrices de l'apeline : survie des cellules, diminution de l'hypertrophie, de la dilatation, de l'inflammation, de la fibrose et du stress oxydatif, amélioration de la contractilité et stimulation de l'angiogenèse et de la vasodilatation. Au vu de tous ces bénéfices et des premiers résultats en clinique avec l'apeline-13 recombinante, l'apeline

affiche un réel potentiel qui pourrait être augmenté par l'utilisation de vecteurs de thérapie génique et ce, pour une amélioration à long terme de la fonction cardiaque.

Aucune étude à ce jour n'a été publiée sur le pouvoir thérapeutique de l'apeline dans l'ischémie du membre. Cependant, des études préliminaires effectuées dans mon équipe, dans un modèle murin d'ischémie de la patte, suggèrent un effet majeur du plasmide surexprimant l'apeline sur le développement du réseau d'artères collatérales (Rayssac, 2010). De plus, l'apeline agirait sur la formation de nouveaux capillaires et sur l'augmentation du diamètre des vaisseaux. Au regard des effets angiogéniques et vasodilatateurs de l'apeline publiés dans les pathologies cardiaques, et suggérés par l'équipe dans l'ischémie du membre, ce peptide pourrait avoir un fort pouvoir thérapeutique en thérapie génique de l'ischémie critique du membre inférieur, voire d'autres pathologies artérielles périphériques.

IV. 3. c) Utilisation de FGF2 en thérapie génique

Plusieurs essais cliniques ont utilisé la protéine recombinante FGF2 pour traiter des pathologies cardiovasculaires, sans pouvoir mettre en avant un bénéfice thérapeutique. En parallèle, plusieurs études précliniques ont cherché à démontrer le potentiel de FGF2 par thérapie génique dans des pathologies nécessitant une stimulation de l'angiogenèse.

Heilmann et coll. ont comparé les bénéfices d'un plasmide exprimant FGF2 par rapport à la protéine recombinante. Ce plasmide a été injecté dans le myocarde dans un modèle porcin de sténose d'une branche descendante antérieure de l'artère coronaire gauche. Le transfert de gène a permis d'améliorer la contractilité et la perfusion régionales. De plus, il a été démontré que le plasmide est plus efficace que la protéine recombinante (C. Heilmann *et al.*, 2002; C. A. Heilmann *et al.*, 2003). Le facteur FGF2 transféré à l'aide d'un vecteur adénoviral dans des cœurs de lapins micro-embolisés a également été bénéfique (Iwatate *et al.*, 2001). Ce vecteur a permis l'augmentation de la fonction systolique du ventricule gauche, du flux sanguin collatéral et de la densité vasculaire.

D'autres études de thérapie génique surexprimant FGF2 ont été réalisées dans l'ischémie du membre inférieur. Dans un modèle murin, la surexpression de ce facteur par le transfert de gène avec un vecteur Sendai, mène à l'amélioration du flux sanguin dans la patte (Onimaru *et al.*, 2002). Avec ce même vecteur, Masaki et coll. ont confirmé une amélioration de la perfusion sanguine, associée à une meilleure récupération du membre et à une augmentation du facteur VEGF endogène (Masaki *et al.*, 2002). A l'inverse, la surexpression de VEGF₁₆₅ accélère l'amputation du membre et ne génère aucune amélioration de la perfusion. La maturation des vaisseaux nouvellement formés est perturbée par cette

surexpression. De plus, les effets bénéfiques obtenus avec FGF2 sont fortement diminués par le blocage de VEGF endogène par un anticorps neutralisant. Ces résultats indiquent que le VEGF endogène est nécessaire pour garantir l'effet thérapeutique de FGF2, et qu'il est important de ne pas trop fortement exprimer VEGF pour traiter l'ischémie du membre. En 2007, une étude est parue sur la surexpression de FGF2 en utilisant un plasmide, dans un modèle murin d'ischémie du membre (J. S. Lee *et al.*, 2007b). Elle démontre les effets bénéfiques de FGF2 sur la perfusion, sur la perte du membre, sur la densité des vaisseaux matures et sur l'expression de gènes connus pour être associés à l'artériogénèse. Enfin, notre équipe a confirmé, dans un autre fond génétique que le transfert du gène FGF2 avec un plasmide, stimule la maturation des vaisseaux ainsi que la formation de capillaires, augmente le flux sanguin, réduit le pourcentage de nécrose du tissu et l'inflammation, sans générer d'effets secondaires tels que la progression tumorale (Rayssac *et al.*, 2009).

En 2006, un essai clinique de phase 1/2a a été initié avec un vecteur Sendaï non répliquatif exprimant FGF2, pour le traitement de l'ischémie critique du membre (Yonemitsu *et al.*, 2013). 12 patients présentant une douleur au repos ont reçu ce traitement, trois d'entre eux souffrant d'ulcères ischémiques. Le vecteur administré en injection intramusculaire n'a eu aucun effet indésirable sévère, et n'a pas provoqué d'événement cardiovasculaire, après 6 mois. Aucune particule virale n'a été détectée, les quantités de cytokines pro-inflammatoires et les niveaux de FGF2 dans le plasma n'ont pas augmenté. Le transfert de FGF2 à l'aide d'un SeV, dans ce premier essai clinique utilisant ce type de vecteur, s'avère sûr et bien toléré. En outre, des améliorations continues et significatives ont été observées par rapport à la classification de Rutherford, à la distance maximale parcourue sans douleur de claudication, et à la douleur au repos. Ces résultats ont permis l'initiation d'un essai clinique de phase IIb au Japon en 2014.

IV. 3. d) Utilisation de Cyr61 en thérapie génique

Cyr61 a été utilisé en thérapie génique, seulement dans trois études. La première a examiné les effets angiogéniques du transfert de gène induit par un vecteur adénoviral dans un modèle d'ischémie du membre inférieur, chez le lapin, en parallèle de ceux observés avec VEGF₁₆₅ (Fataccioli *et al.*, 2002). Le flux sanguin augmente 40 jours après l'injection de Cyr61 et ce, plus fortement que celui du groupe VEGF. Le diamètre de la lumière de l'artère iliaque interne, le développement des vaisseaux collatéraux et la densité capillaire ont également évolué favorablement avec le vecteur adénoviral exprimant Cyr61. Pour la plupart des paramètres, ces améliorations excèdent celles obtenues avec le vecteur codant pour VEGF. Quelques années plus tard, notre équipe a mis en évidence le caractère pro-angiogénique du plasmide surexprimant Cyr61 dans un modèle murin d'ischémie du membre (Rayssac *et al.*,

2009). Le transfert de ce gène augmente le flux sanguin à 7 et 14 jours, le tissu est moins nécrosé, l'inflammation moins importante, l'index de perfusion plus élevé ainsi que la densité capillaire. Il faut cependant noter qu'une forte quantité de Cyr61 est responsable d'une accélération de la progression tumorale (Rayssac *et al.*, 2009).

Très récemment, le potentiel de Cyr61 sur la protection myocardique a été mis en évidence (K. Meyer *et al.*, 2016). Des études précédentes ont suggéré que l'induction du programme de sénescence dans les fibroblastes cardiaques peut limiter la progression de la fibrose ce qui restreindrait la production excessive de matrice extracellulaire et le remodelage de tissu dans le cœur. Pour tester cette hypothèse, l'équipe a surexprimé Cyr61 avec un AAV9 dans le cœur de souris ayant subi une constriction aortique transverse (TAC) puisque Cyr61 est connu pour induire la sénescence des fibroblastes dans les processus de cicatrisation. La sénescence prématurée des fibroblastes a été observée dans le groupe surexprimant Cyr61 après la TAC. De plus, ceci s'accompagne d'une réduction de la fibrose périvasculaire et de la fibrose ventriculaire interstitielle, qui mène alors à l'amélioration de la fonction cardiaque.

IV. 3. e) Les limites des études cliniques de thérapie génique

Malgré les résultats encourageants des phases I et II des essais cliniques de thérapie génique pour les pathologies cardiovasculaires, très peu d'études incluant un large nombre de patients et un contrôle placebo ont permis de confirmer les bénéfices préalablement obtenus. La thérapie génique manque d'efficacité et il devient important de multiplier les études transversales pour identifier les raisons de ces échecs et développer des solutions, dans la mesure du possible.

La sélection des patients inclus dans les études peut être une des raisons des échecs rencontrés. Les patients sélectionnés sont souvent ceux pour lesquels aucune solution thérapeutique existante n'est envisageable. La thérapie génique intervient probablement trop tardivement pour qu'une stimulation de l'angiogenèse apporte un bénéfice dans une zone trop fortement atteinte. Il existe peut-être un point de non-retour, lorsqu'il n'est plus possible de rendre viable une zone déjà trop endommagée. Même s'il est probable que la thérapie génique ait un pouvoir plus important dans des phases plus précoces des maladies cardiovasculaires, il est éthiquement difficile d'inclure, dans les essais cliniques, des patients pour lesquels plusieurs alternatives thérapeutiques sont encore possibles. De plus, dans une même cohorte, les patients n'ont pas le même état de santé, l'homéostasie du tissu ciblé diffère, le réseau vasculaire n'est pas atteint de la même manière et les médicaments délivrés en parallèle ne sont pas toujours les mêmes suivant les patients. Cette hétérogénéité peut nuire à la reproductibilité des résultats initialement positifs de la

thérapie génique. Il faut savoir par exemple que certains traitements cardioactifs (aspirine, captopril, lovastatine et furosémide) de même que des problèmes de santé tels qu'une hypercholestérolémie ou le diabète ont un impact négatif sur la réponse à l'angiogenèse (Cochain *et al.*, 2013; Kutryk *et al.*, 2001). L'âge du patient et le tabagisme sont également des facteurs aggravants qui peuvent nuire au bénéfice de la thérapie génique, quelle soit pro-angiogénique ou cardioprotectrice. Les effets des facteurs thérapeutiques peuvent différer selon l'état du tissu, en présence d'athérosclérose diffuse, ou de dysfonction endothéliale. Dans le cas de l'ischémie du membre inférieur, les patients avec une sévère ischémie (stade IV de la classification de Fontaine) sont déjà plus réfractaires à une telle stratégie de revascularisation (Silvestre *et al.*, 2013). De même, le micro-environnement cardiaque d'un patient ayant subi un infarctus aigu n'est pas le même que celui d'un patient en insuffisance cardiaque avancé. Il faudrait adapter la revascularisation thérapeutique en fonction du type et du stade de la maladie ischémique.

Le succès de la thérapie génique dépend également de l'efficacité avec laquelle le gène est introduit et exprimé dans la population cellulaire ciblée. La demi-vie courte des protéines recombinantes est un frein au développement d'un réseau vasculaire fonctionnel. Les plasmides présentent une faible efficacité de transfert de gène, et ne permettent pas une expression à long terme. Les vecteurs adénoviraux souvent utilisés en essais cliniques comme les plasmides, permettent d'augmenter le nombre de cellules surexprimant le transgène, seulement ils déclenchent une réponse anti-inflammatoire et immune, entraînant la diminution de l'expression et des bénéfices pro-angiogéniques. L'essai clinique utilisant un AAV surexprimant SERCA2a a échoué à un stade avancé à cause d'une administration inefficace du transgène. La dose délivrée ne serait pas la raison de cet échec. Même si la durée d'expression de l'AAV n'a pas été étudiée dans cet essai, d'autres ont montré qu'il perdurait plusieurs mois. Ylä-Herttuala, dans son éditorial de 2015, pointe du doigt l'efficacité de la technique d'injection (Ylä-Herttuala, 2015). Il s'agissait d'une administration unique en intracoronaire. La plupart des AAV se lient aux glycoprotéines polysaccharides présents sur l'endothélium vasculaire, ils n'auraient alors pas traversé efficacement cette barrière pour atteindre le myocarde (Gruchala *et al.*, 2004). De plus, le flux sanguin rapide de l'artère coronaire élimine rapidement le vecteur vers la circulation. D'autres techniques d'administration ont été étudiées (application systémique, injection dans la veine coronaire, injection intracardiaque). A l'heure actuelle, la méthode la plus efficace semble être l'injection directe dans le myocarde. L'injection rétrograde via le sinus coronaire peut aussi être efficace mais c'est une procédure beaucoup plus compliquée et moins pratique pour une future thérapie clinique (Ylä-Herttuala, 2015). Cependant, l'injection intramusculaire, qu'elle soit cardiaque ou au niveau du membre atteint, présente le désavantage de

transduire seulement les cellules localisées près du site d'injection (environ 5mm chez l'homme (Hinkel *et al.*, 2011)). Dans la plupart des essais cliniques, les injections dans le muscle ischémique se font sans ultrasonographie ce qui peut mener à une administration dans le tissu sous-cutané au lieu du muscle squelettique (Annex, 2013). Il existe en plus un risque de saignement et de relargage de biomarqueurs en relation avec le volume injecté (Hinkel *et al.*, 2011).

Bien que les techniques d'administration doivent encore être développées pour augmenter le taux de transfection ou de transduction, tout en garantissant une certaine simplicité d'exécution et une sécurité pour le patient, d'autres paramètres nécessitent encore d'être améliorés. En plus du désavantage de ne pouvoir inclure qu'un faible pourcentage de la population dans les essais cliniques avec un AAV, certains pensent que la présence d'anticorps neutralisants, même si elle n'était pas détectable, a sans doute éliminé le vecteur dans le cas de l'essai clinique avec SERCA2a. D'importants efforts sont fournis depuis plusieurs années pour contourner ce problème tout en conservant les avantages d'un tel vecteur (Chicoine *et al.*, 2014; Gyorgy *et al.*, 2014; Louis Jeune *et al.*, 2013).

A l'heure actuelle, même si le lentivecteur est moins efficace que l'AAV et le vecteur adénoviral pour transduire les cellules cardiaques et qu'il est difficile d'obtenir des titres élevés, il génère une réponse inflammatoire ou immune bien plus faible que ces deux autres vecteurs, et permet une expression à long terme (Merentie *et al.*, 2016). Il serait sans doute bénéfique d'approfondir les recherches sur l'optimisation du lentivecteur pour un transfert de gène efficace dans le myocarde et le muscle squelettique.

Enfin, la raison du manque d'efficacité de la thérapie génique cardiovasculaire que beaucoup d'études abordent, est l'administration d'un seul facteur. Limiter le remodelage néfaste et établir un réseau vasculaire stable et fonctionnel nécessitent l'implication d'une multitude de facteurs et de voies de signalisation. Il est effectivement peu probable qu'un seul gène soit suffisant pour traiter ce type de pathologie. La thérapie cellulaire, grâce aux capacités de différenciation et de sécrétion de facteurs paracrines des cellules souches, ou la thérapie génique combinée (transfert de plusieurs gènes) pourraient être une solution pour apporter des bénéfices thérapeutiques plus importants.

IV. 4) Thérapie cellulaire

L'administration de cellules souches ou progénitrices présente un intérêt dans le traitement de pathologies ischémiques de par le fait qu'elles peuvent se différencier en différents types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les myocytes, les myofibroblastes ou les fibroblastes, mais également et surtout grâce à leurs effets paracrines qui stimulent la revascularisation, la survie des cellules présentes ou l'activation des cellules progénitrices endogènes.

Les cellules dites progénitrices endothéliales (CPE) ont été identifiées comme des monocytes pro-angiogéniques. Elles sont mobilisées de leurs niches, de la moelle osseuse par exemple, vers le sang périphérique et atteignent ensuite le tissu hypoxique où elles jouent un rôle dans la revascularisation et la régénération (Asahara *et al.*, 1999; Asahara *et al.*, 1997). Cependant, l'absence de définition claire de la nature des CPE a mené à une certaine confusion et à un ralentissement des recherches ayant pour but de comprendre les mécanismes d'action de ces cellules (D. Smadja *et al.*, 2013). Pour surmonter ces limitations, la majorité des études cliniques se sont concentrées sur l'utilisation des cellules autologues mononucléaires issues de la moelle osseuse ou mobilisées dans le sang périphérique. Ces populations sont susceptibles de contenir des CPE, elles sont faciles à isoler, elles peuvent sécréter des facteurs angiogéniques et faciliter la néovascularisation (Hamano *et al.*, 2002). En fonction des études cliniques, les cellules mononucléaires utilisées étaient soit des cellules non sélectionnées, soit des cellules triées en fonction de la présence de certains marqueurs (CD34 et CD133). L'expression de ces marqueurs ne permet pas de distinguer les cellules pro-angiogéniques des cellules hématopoïétiques, mais l'utilisation de cellules triées par d'autres marqueurs est difficile en clinique à cause du nombre limité de ce type de cellules dans la moelle osseuse ou le sang périphérique (Massa *et al.*, 2005). Il s'agit d'ailleurs du principal problème de la thérapie cellulaire. La solution peut être de multiplier les cellules provenant du patient *ex vivo*, mais la culture altère le phénotype, les caractéristiques et le potentiel angiogénique des certains types cellulaires (Hai-Jiang *et al.*, 2008).

Les nombreux essais cliniques menés jusqu'à maintenant, utilisant différentes populations de fractions cellulaires pro-angiogéniques, ont été de petite envergure mais les résultats obtenus sont très encourageants. Ces essais de thérapie cellulaire pour les maladies artérielles périphériques ou cardiaques sont détaillés dans les revues de Silvestre et coll. (2013) et Grochot-Przeczek et coll. (2013). Ces études ont démontré que la thérapie

cellulaire est réalisable dans une population à risque et potentiellement efficace pour le traitement de ces pathologies.

IV. 4. a) Thérapie cellulaire de l'ischémie des membres inférieurs

Le premier essai réalisé sur des patients atteints d'ischémie du membre fut l'étude TACT basée sur la transplantation intramusculaire de cellules mononucléaires de la moelle osseuse (Tateishi-Yuyama *et al.*, 2002). Après 24 semaines, l'ABI et l'oxygénation du tissu ont augmenté avec le développement de vaisseaux collatéraux. La douleur au repos a diminué et la distance parcourue sans douleur s'est allongée. Ces résultats ont été confirmés par de nombreux autres essais cliniques de petites tailles (Koshikawa *et al.*, 2006; Motukuru *et al.*, 2008; Saigawa *et al.*, 2004). Des bénéfices similaires ont aussi été obtenus après l'administration de cellules CD34⁺ mobilisées dans le sang par le G-CSF (EPOCH-CLI, (Kawamoto *et al.*, 2009)). La surface de l'ulcère a été réduite et l'oxygénation du tissu a augmenté avec la distance de marche. De nombreuses études pilotes ou de phase I/II ont aussi été réalisées dans le but de démontrer l'efficacité des cellules CD133⁺ de la moelle osseuse, des cellules mononucléaires issues du sang périphérique, ou des CSM chez des patients atteints d'ischémie critique du membre.

L'administration intramusculaire a été utilisée dans la plupart des essais. Une étude a également démontré que l'injection intra-artérielle est faisable et qu'elle permet des résultats similaires à ceux obtenus après injection intramusculaire (Klepanec *et al.*, 2012). Cela n'a cependant pas été confirmé par méta-analyse (Ai *et al.*, 2016), l'administration intra-artérielle n'étant pas assez efficace pour délivrer des cellules dans une zone ischémique alors que le réseau vasculaire est endommagé.

Les études pilotes ont démontré un réel potentiel de la thérapie génique dans cette pathologie, sans effet indésirable. Des essais plus larges avec un contrôle placebo ont montré également des résultats prometteurs, avec une amélioration de la survie sans amputation (Idei *et al.*, 2011; Powell *et al.*, 2011), ou une accélération de la guérison de l'ulcère et une diminution de la douleur bien que l'index de pression sanguine ne soit pas amélioré (Walter *et al.*, 2011). En parallèle, l'injection intra-artérielle répétée de cellules autologues mononucléaires de la moelle osseuse n'a pas permis de mettre en évidence de différence avec le groupe placebo sur le taux d'amputation, la mortalité, la qualité de vie, la douleur, l'ABI ou la pression en oxygène transcutanée (JUVENTAS, (Teraa *et al.*, 2015).

Plusieurs méta-analyses ont été effectuées mais les résultats sont parfois contradictoires (Liew *et al.*, 2016; F. P. Liu *et al.*, 2012; Y. Liu *et al.*, 2015; Moazzami *et al.*, 2014; Teraa *et al.*, 2013; Z. X. Wang *et al.*, 2014). La dernière en date (Ai *et al.*, 2016) inclut 25 essais cliniques avec 1130 patients, souffrant de maladies artérielles périphériques et d'ischémie critique du membre et s'intéresse à tous les paramètres utilisés en clinique pour démontrer les bénéfices de la thérapie cellulaire. En conclusion de cette étude, quel que soit la population traitée, ce type de thérapie réduit le taux d'amputation majeure et augmente les chances de survie sans amputation. Le taux de mortalité, toutes causes confondues, n'est pas significativement différent entre les groupes, bien que la thérapie cellulaire semble relativement avantageuse. L'étude des paramètres secondaires indique que l'injection de cellules souches améliore l'ABI, augmente le taux de guérison des ulcères, et la pression en oxygène transcutanée. Les douleurs du membre sont également réduites et la capacité de déplacement est améliorée. Cependant, une analyse des sous-groupes (type cellulaire, temps de suivi, type de contrôle, biais de la conception de l'étude et mode d'administration) indique une hétérogénéité causée par ces trois derniers paramètres. Suivant les sous-groupes sélectionnés pour l'analyse, la thérapie cellulaire apparaît comme inefficace. Les auteurs en concluent que des essais cliniques randomisés à plus grande échelle, en utilisant un groupe placebo et en double aveugle, doivent être réalisés pour pouvoir confirmer et valider ces résultats.

Il faut également noter que les patients qui nécessitent ce genre de thérapie sont souvent âgés, et cela affecte la population des cellules angiogéniques dérivées de la moelle osseuse ou du sang périphérique (Jie *et al.*, 2009; Thum *et al.*, 2007). De plus, les maladies ischémiques sont souvent accompagnées d'hypertension, de diabète, d'hypercholestérolémie, ce qui peut influencer le nombre de cellules progénitrices et altérer leur fonctionnement (Sekiguchi *et al.*, 2009). Il semble par conséquent intéressant et important de développer des stratégies permettant l'expansion des cellules *in vitro* et l'augmentation du potentiel de différenciation et de sécrétion des cellules en combinant la thérapie cellulaire à la thérapie génique. Cependant, cette stratégie d'angiogenèse thérapeutique donne de sérieux espoirs pour les patients pour lesquels aucune revascularisation n'a été possible et qui n'ont pas de solutions médicamenteuses ou chirurgicales.

IV. 4. b) Thérapie cellulaire des pathologies ischémiques cardiaques

Les capacités du cœur à se régénérer suite à des dommages à l'âge adulte ne sont pas suffisantes pour compenser la perte de fonction. Plusieurs approches ont vu le jour pour chercher à stimuler le processus de régénération, comme la transplantation de cellules souches adultes autologues cardiaques, de la moelle ou du sang périphérique, l'injection de cardiomyocytes obtenus *in vitro*, la reprogrammation des fibroblastes cardiaques en cardiomyocytes *in vivo*, la stimulation de la dédifférenciation et de la prolifération des cardiomyocytes résidents et l'activation des cellules progénitrices cardiaques endogènes (Silvestre et Menasche, 2015).

Les résultats positifs d'études précliniques incluant des approches de thérapie cellulaire ont encouragé le développement d'essais cliniques. Beaucoup d'essais ont été initiés, mais les résultats restent ambigus. Pour la plupart, les cellules utilisées sont des cellules mononucléaires de la moelle osseuse, cependant des cellules souches mésenchymateuses (CSM), des cellules CD133+ de la moelle, des cellules CD34+ mobilisées, des cellules progénitrices endothéliales précoces et des cellules mononucléaires du sang périphérique ont également été testées et avec quelques succès (Silvestre *et al.*, 2013). Par exemple, un essai clinique incluant 39 patients atteints d'insuffisance cardiaque ischémique terminale a démontré un effet bénéfique de l'administration de cellules souches mononucléaires du sang périphérique sur la fraction d'éjection (Arguero *et al.*, 2006). L'administration de cellules CD133+ à des patients souffrant d'insuffisance cardiaque ischémique chronique a permis également d'améliorer la fraction d'éjection, et de diminuer le risque de mort soudaine après deux ans (Flores-Ramirez *et al.*, 2010).

Thérapie cellulaire après infarctus aigu du myocarde

Pour la première fois, en 2002, une étude a montré sur 10 patients que l'injection intracoronaire de cellules mononucléaires de la moelle osseuse autologues est sûre et semble être efficace (Strauer *et al.*, 2002). Après 3 mois, la taille de l'infarctus a diminué, ainsi que le volume du ventricule en systole et la contractilité et la perfusion du myocarde dans la zone endommagée se sont améliorées.

Plus tard, deux essais cliniques ont été réalisés sur des patients après infarctus aigu du myocarde (BOOST, (Wollert *et al.*, 2004); REPAIR-AMI, (Schachinger *et al.*, 2006a)). L'injection intracoronaire de cellules dérivées de la moelle osseuse a permis une amélioration de la fonction du ventricule gauche 6 et 4 mois après, respectivement. A 18

mois, la fonction cardiaque était similaire entre les groupes dans l'essai BOOST, alors que les améliorations cliniques de l'essai REPAIR-AMI étaient maintenues après 12 mois et 5 ans (Assmus *et al.*, 2014; G. P. Meyer *et al.*, 2006; Schachinger *et al.*, 2006b). Ces résultats ont été contredits par d'autres études qui n'ont pas trouvé de différence significative avec ce type de thérapie cellulaire sur la fonction cardiaque (Janssens *et al.*, 2006; Lunde *et al.*, 2006).

Face à ces résultats mitigés, plusieurs méta-analyses ont été effectuées (Abdel-Latif *et al.*, 2007; Delewi *et al.*, 2014; Jeevanantham *et al.*, 2012; Lipinski *et al.*, 2007; Martin-Rendon *et al.*, 2008). Toutes ces études concluent que la fraction d'éjection est améliorée par la thérapie cellulaire et que la taille de l'infarctus et le volume ventriculaire gauche sont diminués. Il a aussi été démontré que les patients les plus jeunes, et ceux qui ont une faible fraction d'éjection avant la thérapie, sont ceux pour lesquels la thérapie cellulaire présente le plus de bénéfices (Delewi *et al.*, 2014). Au contraire, une méta-analyse récente sur les données individuelles des patients révèle que la thérapie cellulaire ne génère aucun bénéfice en termes d'événements cliniques ou de fonction ventriculaire après infarctus aigu du myocarde (Gyongyosi *et al.*, 2015). Les quelques divergences entre les essais cliniques de grande envergure peuvent être expliquées par les différences de critères d'inclusion des patients et de procédures d'isolation et de stockage des cellules (Seeger *et al.*, 2007).

La plupart des essais cliniques se sont focalisés sur la fraction d'éjection pour évaluer l'efficacité de la thérapie cellulaire, cependant, il a été montré que la viabilité du myocarde représente un paramètre fiable pour prédire la récupération de la fonction cardiaque et la survie à long terme après revascularisation (Senior *et al.*, 1999). L'essai BONAMI a été initié avec pour premier objectif d'évaluer l'effet des cellules mononucléaires de la moelle osseuse sur la viabilité du myocarde et pour identifier des facteurs prédictifs de l'amélioration de cette viabilité (Roncalli, 2014). Cette étude a mis en évidence une amélioration de la viabilité par la thérapie cellulaire trois mois après un infarctus aigu du myocarde. Les patients non fumeurs ont bénéficié d'une meilleure amélioration de cette viabilité et une tendance a été observée chez les patients avec une occlusion microvasculaire. Il a été également démontré que la population de cellules progénitrices endothéliales chez les fumeurs actifs est plus faible dans la moelle et dans le sang que celle des patients non fumeurs (Roncalli, 2014).

De larges essais cliniques de phase II et III sont maintenant nécessaires pour rechercher les différences entre les cellules dérivées de la moelle, sélectionnées ou non, pour évaluer l'impact du traitement sur la morbidité et la mortalité et pour identifier la population pour laquelle la thérapie sera la plus efficace.

Thérapie cellulaire en insuffisance cardiaque ischémique

L'insuffisance cardiaque pose plus de problèmes étant donné la présence et le rôle de la fibrose cardiaque. Les essais cliniques incluant des patients souffrant d'insuffisance chronique ne sont pas encore très avancés et les résultats sont fortement contradictoires. L'étude STAR qui a impliqué 191 patients en IC chronique due à une cardiomyopathie ischémique, sur une période de 5 ans, a suggéré que la fraction d'éjection ventriculaire et la mortalité étaient améliorées et de façon persistante par la thérapie à base de cellules dérivées de la moelle osseuse (Strauer *et al.*, 2010). Cependant une étude parue en 2012 n'a confirmé aucun bénéfice de cette thérapie cellulaire sur les 92 patients enrôlés avec une IC chronique ischémique (Perin *et al.*, 2012). Une méta-analyse effectuée sur 31 essais randomisés incluant 1521 patients en insuffisance cardiaque a néanmoins révélé une amélioration de la fraction d'éjection et de la qualité de vie des patients traités (Fisher *et al.*, 2015).

IV. 4. c) Les cellules souches mésenchymateuses pour une thérapie cellulaire

La communauté scientifique s'est intéressée également à l'utilisation des CSM pour traiter les pathologies cardiovasculaires après qu'il a été suggéré que ces cellules présentent une importante plasticité, ayant la capacité de se différencier en divers types cellulaires incluant les myoblastes et les cellules vasculaires. Ces cellules sont faciles à isoler à partir de la moelle osseuse, ou du sang de cordon ombilical, et peuvent s'amplifier *in vitro*. Elles ont également la capacité de migrer vers la zone endommagée, et présentent des propriétés immunosuppressives fortes qui peuvent être exploitées pour des transplantations hétérologues. D'ailleurs la possibilité de transplantation allogénique est un avantage important puisque les pathologies ischémiques peuvent altérer le nombre et la fonction des cellules utilisées en thérapie cellulaire (Jie *et al.*, 2009; Sekiguchi *et al.*, 2009; Thum *et al.*, 2007). En plus de leur capacité de différenciation, les CSM peuvent aussi exercer des effets thérapeutiques via la sécrétion de facteurs paracrines. Les CSM sont relativement résistantes à l'apoptose induite par une réduction de sérum ou par l'hypoxie (Iwase *et al.*, 2005). Enfin, il est possible d'influencer la différenciation *in vitro* avant transplantation pour éviter une différenciation aberrante *in vivo* (Liew et O'Brien, 2012).

Les CSM dans l'ischémie critique du membre

L'administration de CSM issues de différentes sources (moelle osseuse, sang de cordon, membrane fœtale, tissu adipeux) a permis des améliorations importantes dans les modèles

animaux d'ischémie du membre (Al-Khalidi *et al.*, 2003; Ishikane *et al.*, 2008; Liew et O'Brien, 2012). Les effets bénéfiques varient suivant les études : la perfusion du membre est toujours améliorée après thérapie cellulaire, la densité capillaire est souvent plus importante mais la régénération du muscle, la fibrose, la nécrose et la perte du membre ne sont pas toujours améliorés. Néanmoins, de nombreux rapports d'études précliniques ont conclu que les CSM sont efficaces pour traiter l'ischémie critique du membre. Des essais cliniques ont alors vu le jour, permettant de mettre en évidence la sûreté de ce type de thérapie cellulaire et son efficacité. Un essai de phase I effectué sur 7 patients souffrant d'ischémie critique du membre a démontré que l'injection intra-artérielle des CSM est capable d'augmenter l'ABI et la pression en oxygène transcutanée (Das *et al.*, 2013). Six des sept ulcères ont montré une guérison partielle ou complète et il y a eu 86% de récupération des membres. En 2011, une étude a permis de comparer les CSM issues de la moelle osseuse avec les cellules mononucléaires également issues de la moelle osseuse (Lu *et al.*, 2011). Après 24 mois, l'amélioration de la perfusion du membre avec les CSM s'est avérée plus importante. La distance de marche, l'ABI et la pression en oxygène transcutanée ont été accrues suite au traitement par injection de CSM et le taux de guérison de l'ulcère dans ce groupe a été plus élevé à 6 semaines et a atteint 100%, 4 semaines avant le groupe ayant reçu des cellules mononucléaires. Les premières études avec de petits nombres de patients démontrent que la thérapie cellulaire avec des CSM est bien tolérée et plus efficace que celle avec des cellules mononucléaires de la moelle osseuse. Cependant, il faut multiplier le nombre de patients traités pour pouvoir confirmer ces résultats, en constituant également un groupe placebo.

Les CSM dans les cardiopathies ischémiques

L'implantation de CSM dans des modèles animaux de maladie cardiaque a également suggéré que ces cellules ont un pouvoir thérapeutique important. Alors que certains auteurs démontrent que les CSM se différencient en cardiomyocytes dans le myocarde chez la souris (Toma *et al.*, 2002), d'autres démontrent qu'elles favorisent la sécrétion de MMP par les fibroblastes cardiaques et que l'injection intracardiaque dans un modèle d'insuffisance post-ischémique induit une diminution de la fibrose ventriculaire, associée à une amélioration des paramètres morphologiques et fonctionnels cardiaques (Mias *et al.*, 2009). Peu d'essais cliniques ont été initiés avec l'injection intracoronaire ou intramyocardique de CSM. Une étude a démontré la sûreté et l'efficacité potentielle de l'injection allogénique en intraveineux de CSM après infarctus du myocarde (Hare *et al.*, 2009). L'étude POSEIDON a, quant à elle, consisté à injecter des CSM autologues ou allogéniques à 30 patients souffrant d'une dysfonction du ventricule gauche causée par un infarctus (Hare *et al.*, 2012). Les deux

groupes ont été associés à un faible taux d'événements défavorables sérieux, sans aucune trace de réponse immune. Alors que la transplantation allogénique réduit plus fortement les volumes télédiastoliques du ventricule gauche, l'injection de CSM autologues améliore plus nettement le test de marche sur 6 minutes. Cependant, aucune des administrations de CSM n'augmente la fraction d'éjection. Ce travail a démontré que le traitement allogénique est sûr et que l'amélioration fonctionnelle est étonnamment plus importante avec une faible dose de CSM. La comparaison de l'efficacité des CSM avec celle des cellules mononucléaires de la moelle osseuse a également été étudiée dans les cardiomyopathies ischémiques (TAC-HFT, (Heldman *et al.*, 2014). L'incidence d'événements sévères au cours de la première année est similaire dans les deux groupes, cependant le traitement par les CSM a permis une augmentation de la distance de marche et de la fonction myocardique régionale ainsi qu'une diminution de la taille de l'infarctus, alors qu'aucun changement dans ces paramètres n'a été observé dans le groupe ayant reçu des cellules mononucléaires de la moelle osseuse. Dans cette étude, les injections des deux types de populations cellulaires n'ont pas modifié le volume de la chambre du ventricule gauche ni la fraction d'éjection. Enfin, les résultats d'une étude pilote française, MESAMI, ont été récemment publiés (Guijarro *et al.*, 2016). Elle concernait 10 patients souffrant d'une sévère ischémie myocardique chronique réversible et d'une dysfonction cardiaque. Suite à une injection autologue de CSM, des améliorations ont été observées concernant les performances cardiaques, le remodelage du ventricule gauche, et le statut fonctionnel des patients. L'essai MESAMI2 permettra d'étudier l'efficacité de ce traitement sur une population plus importante. Au même titre que les essais sur les patients souffrant d'ischémie critique du membre, il faudra multiplier les études cliniques de transplantation de CSM pour pouvoir attester d'un réel effet bénéfique d'une telle thérapie.

Amélioration du potentiel des CSM dans le cœur

Même si les résultats préliminaires en clinique sont prometteurs, le taux de survie des CSM est faible après transplantation dans le cœur. Diverses stratégies ont tenté d'améliorer la survie des cellules et beaucoup d'entre elles montrent des résultats prometteurs. Tout d'abord, l'injection intramyocardique semble permettre une meilleure rétention des cellules dans le tissu que l'injection intracoronaire ou l'infusion veineuse coronaire rétrograde (Hou *et al.*, 2005), ce qui évite de plus des effets potentiels néfastes dus à la présence de ces cellules dans d'autres organes. Cependant, l'injection à l'aide d'une aiguille dans le myocarde présente quelques désavantages comme des dommages au niveau du site d'injection ou une distribution non homogène des cellules. Des systèmes de patchs sont étudiés en phase préclinique pour favoriser la rétention des cellules ; ces patchs peuvent être constitués d'une succession de quelques couches de cellules confluentes cultivées dans

des boîtes thermosensibles ou pré-enduites de fibrine, permettant des interactions cellule-cellule et la présence d'une matrice extracellulaire abondante. Ils peuvent également être constitués de biomatériaux comme des hydrogels thermosensibles synthétiques ou naturels (L. Li *et al.*, 2016). De plus, l'exposition des CSM à l'hypoxie avant transplantation permet de diminuer de 25% la mort cellulaire un jour après l'injection et jusqu'à 40% trois jours plus tard (Hu *et al.*, 2008). En parallèle, l'hyperoxie favorise la viabilité et la prolifération des CSM en diminuant l'expression de certaines caspases et en augmentant l'expression de gènes de survie tels qu'Akt (Saini *et al.*, 2013). Le pré-conditionnement des cellules par une co-culture avec des cardiomyocytes augmente leur effet thérapeutique (Figeac *et al.*, 2014). La présence de TGF- α dans le milieu de culture des CSM stimule la sécrétion de VEGF par les CSM transplantées *in vivo*, ce qui augmente la capacité des CSM à protéger le myocarde (Herrmann *et al.*, 2010). De même, le pré-traitement avec PDGF-BB induit l'activation rapide d'Akt et d'ERK et augmente VEGF (Xu *et al.*, 2015). La pré-stimulation de FGF2 favorise l'intégration des cellules dans le tissu via des jonctions fonctionnelles entre les CSM et les cellules cardiaques (Preda *et al.*, 2015). Il a également été démontré que le pré-conditionnement des CSM avec de la mélatonine améliore la survie et l'activité pro-angiogénique et mitogène de ces cellules, en stimulant l'expression de FGF2 et HGF (Mias *et al.*, 2008). Certains ont émis l'hypothèse que si l'on traite avec l'apeline-13 des CSM préalablement conditionnées par l'hypoxie, l'efficacité de la thérapie cellulaire pourrait être améliorée (Mottaghi *et al.*, 2012). Il a en effet été démontré que ce peptide favorise une diminution de l'apoptose dans les CSM via les voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK/ERK1/2 (X. Zeng *et al.*, 2012).

La modification génétique des CSM peut également améliorer la survie des cellules et favoriser la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques et cardioprotecteurs dans le myocarde ischémique. Les CSM surexprimant Akt sont par exemple plus résistantes à l'apoptose, et sécrètent plus de facteurs comme VEGF, IGF-1 et FGF2 (Gnecchi *et al.*, 2006). La surexpression d'Ang-1, Hsp-20 (heat shock protein 20), sFRP2 (secreted frizzled related protein 2), survivin, HO-1 (heme oxygenase), GSK-3 β , ERBB4, CCR-1, ou SDF1 présente des effets bénéfiques similaires sur la survie des cellules (Kearns-Jonker *et al.*, 2012; L. Li *et al.*, 2016). La transduction des CSM avec un vecteur adénoviral codant pour PKG1 α (protein kinase G1 α) augmente non seulement la survie des CSM mais également la fonction cardiaque après infarctus chez le rat (L. Wang *et al.*, 2013). La surexpression de FGF2 par un lentivecteur induit la vasculogénèse dans les rats ischémiques (J. C. Zhang *et al.*, 2014) tandis que la transduction d'un vecteur adénoviral codant pour l'ecSOD (extracellular superoxide dismutase) protège le cœur de souris après infarctus grâce en partie à la réduction du stress oxydatif et à l'amélioration de la survie des CSM (Pan *et al.*, 2014).

Il semblerait enfin que l'administration d'un seul type cellulaire ne soit pas suffisante pour favoriser la réparation du tissu, au même titre que l'injection de vecteurs n'exprimant qu'un seul facteur. La co-transplantation de différentes sources de cellules régénératives (CPE, CPML, CSM,...) serait alors une approche prometteuse pour le traitement des pathologies cardiovasculaires ischémiques.

Il reste malgré tout beaucoup de questions en suspens concernant l'angiogenèse thérapeutique basée sur l'administration de cellules souches. On ne sait pas exactement quels types ou combinaisons de cellules doivent être utilisés, comment les cellules doivent être administrées, s'il faut répéter les injections et à quelle fréquence, à quelle population de patients pourrait bénéficier au mieux ce type de thérapie ou si des effets indésirables peuvent apparaître à moyen et long terme.

A l'heure actuelle, les efforts sont dirigés vers le développement de techniques permettant la survie et la rétention des cellules, quel que soit le type et la source, dans le tissu ciblé en les pré-conditionnant avant transplantation, en les modifiant génétiquement *ex vivo*, et/ou en les associant avec des biomatériaux. Comme il a été démontré que plusieurs facteurs favorisent la survie des CSM, stimulent la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques ou réduisent le stress oxydatif, il serait très intéressant de développer des vecteurs permettant de combiner plusieurs molécules pour amplifier le potentiel cardioprotecteur de la transplantation de CSM.

V. Thérapies géniques combinées

Pour revue (Renaud-Gabardos *et al.*, 2015), en annexe 1

La thérapie génique combinée est apparue depuis plusieurs années comme une approche attractive pour optimiser les bénéfices thérapeutiques du transfert de gène.

Comme il a été démontré précédemment, l'utilisation de facteurs de croissance ou de molécules pro-angiogéniques est une approche prometteuse pour induire l'angiogenèse dans les pathologies ischémiques cardiaques ou du membre inférieur. Cependant, l'administration d'un seul facteur, que ce soit sous forme de protéine recombinante ou par transfert de gène, ne semble pas suffisante pour obtenir de réels bénéfices chez l'homme. De nombreux articles mettent en avant l'importance de développer des thérapies avec plusieurs facteurs. Dans ces deux pathologies, comme cela a été décrit précédemment, plusieurs molécules interviennent indépendamment ou de façon complémentaire dans les processus de remodelage cardiaque et vasculaire. L'angiogenèse, par exemple, requiert une cascade de facteurs de croissance, de leurs récepteurs, et de signaux intracellulaires. Une thérapie efficace requiert alors l'application de plusieurs facteurs et cela a été démontré à plusieurs reprises dans les maladies cardiovasculaires.

La co-administration des protéines recombinantes de VEGFA et d'Ang-1 dans des cellules endothéliales d'artère coronaire porcine, puis l'injection de deux plasmides exprimant ces deux facteurs de croissance dans un modèle d'ischémie du membre, ont permis d'augmenter les effets sur la vascularisation collatérale, en comparaison des effets obtenus avec l'une ou l'autre de ces molécules (Chae *et al.*, 2000) (Tableau 3). Quelques années plus tard, les protéines recombinantes de FGF2 et de PDGF-B ont également amélioré l'ischémie du membre chez le rat de façon synergique (Cao *et al.*, 2003). De même, un vecteur bicistronique exprimant FGF2 et VEGFA₁₆₅ induit efficacement la formation de vaisseaux suite à un test angiogénique chez la souris, et ce plus fortement que les vecteurs monocistroniques (Malecki *et al.*, 2004). Ces études ont lancé le concept de biothérapie combinée dans les pathologies cardiovasculaires.

En 2007, deux plasmides exprimant FGF2 et VEGFA ont augmenté la perfusion du tissu et l'artériogenèse dans un modèle murin d'ischémie du membre (J. S. Lee *et al.*, 2007b). Puis, Kupatt et coll. ont démontré, dans l'ischémie du membre chez le lapin et dans l'ischémie cardiaque chez le porc, que VEGFA, exprimé à partir d'un AAV, induit l'angiogenèse mais ne permet pas d'augmenter la perfusion et la collatéralisation à moins que l'AAV-PDGF soit également injecté. De plus, l'association des deux vecteurs améliore la fonction cardiaque

(Kupatt *et al.*, 2010). Enfin, l'association de VEGFA et Ang-1 exprimés à partir de deux vecteurs AAV a amélioré la fonction cardiaque et la perfusion dans un modèle porcin d'infarctus du myocarde, grâce à l'induction de l'angiogenèse, la prolifération des cardiomyocytes, l'activation de voies impliquées dans la survie et la réduction de l'apoptose (Tao *et al.*, 2011) (Tableau 3).

Tableau 3 : Etudes précliniques de thérapie génique combinée des maladies cardiovasculaires avec la co-administration de vecteurs monocistroniques

Pathologies	Gènes thérapeutiques	Modèle animal	Type de vecteur	Référence
Ischémie du membre	VEGFA + Ang-1	Lapin	Plasmide	(Chae <i>et al.</i> , 2000)
Ischémie du membre	VEGFA + FGF2	Souris	Plasmide	(J. S. Lee <i>et al.</i> , 2007b)
Ischémie du membre	VEGFA + PDGFB	Lapin	AAV2/9	(Kupatt <i>et al.</i> , 2010)
Ischémie cardiaque	VEGFA + PDGFB	Porc	AAV2/9	(Kupatt <i>et al.</i> , 2010)
Ischémie cardiaque	VEGFA + Ang-1	Porc	AAV2	(Tao <i>et al.</i> , 2011)

Cependant, l'utilisation de deux vecteurs différents pour l'expression de multiples transgènes présente des désavantages : d'une part, le ratio des molécules thérapeutiques ne peut pas être contrôlé, menant à une perte de l'effet coopératif. L'expression d'un des vecteurs est souvent diminuée voire inexistante au profit de l'autre vecteur (Allera-Moreau *et al.*, 2006). D'autre part, le coût de deux vecteurs thérapeutiques dans une perspective clinique est plus élevé que pour un seul vecteur. Ces inconvénients sont d'autant plus importants dans le cas d'un cocktail de trois gènes thérapeutiques ou plus.

Mon équipe a démontré que l'utilisation des IRES permet de co-exprimer deux gènes d'intérêt de façon stable avec un ratio constant entre les deux protéines contrairement à l'utilisation de deux plasmides différents exprimant chacun un transgène (Allera-Moreau *et al.*, 2007). En effet, les IRES qui sont des activateurs traductionnels présents dans un certain nombre d'ARNm, induisent l'initiation interne de la traduction lorsqu'ils sont présents entre deux gènes. Ils permettent donc la conception de cassettes d'expression multicistroniques, ressemblant à des opérons bactériens, capable d'entraîner la traduction de plusieurs gènes codés par un même ARNm (Fussenegger *et al.*, 1998) (Figure 5).

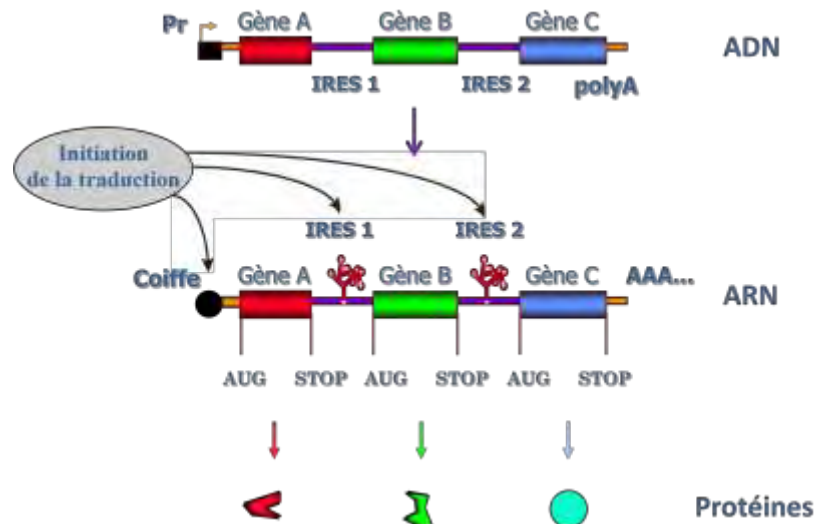


Figure 5 : Le concept de vecteur multicistronique basé sur les IRES.

V. 1) Les IRES, activateurs traductionnels pour une expression combinée de transgènes

V. 1. a) La découverte des IRES

Au moment où il a été admis que l'initiation de la traduction chez les eucaryotes nécessitait la reconnaissance de la partie 5' de l'ARNm coiffé pour recruter les ribosomes, la traduction des ARNm non-coiffés des picornavirus à partir d'un codon initiateur interne restait un mystère. En effet, le mécanisme de balayage des ribosomes prédisait que les ribosomes se liaient à la partie 5' de l'ARNm et scannaient les molécules d'ARN jusqu'à ce qu'ils reconnaissent un codon AUG (Kozak, 1979, 1989). La fixation interne du ribosome n'était donc pas envisageable. Cette énigme posée par les picornavirus a été résolue en 1988 par la découverte d'éléments présents dans des régions 5' non traduites de leurs ARNm, appelés IRES, qui permettent le recrutement interne des ribosomes (Jang *et al.*, 1988; Pelletier et Sonenberg, 1988). Le premier IRES cellulaire a été découvert, trois ans plus tard, sur un ARNm codant pour une protéine chaperonne de l'immunoglobuline, la BiP, aussi connue comme GRP78 (Macejak et Sarnow, 1991). D'autres IRES ont ensuite été découverts dans des ARNm cellulaires, en particulier dans les ARNm de facteurs de croissance angiogéniques tels que FGF2, de proto-oncogènes tels que c-myc, ou de protéines pro- et anti-apoptotiques telles que la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP) et APAF1 (apoptotic peptidase activating factor 1) (Coldwell *et al.*, 2000; Holcik *et al.*, 1999; Nanbru *et al.*, 1997; Stoneley *et al.*, 1998; Vagner *et al.*, 1995a). Des IRES ont aussi été retrouvés dans les rétrovirus, pour lesquels l'ARNm est coiffé comme les ARNm cellulaires, ce qui a mené au

développement de vecteurs rétroviraux contenant un IRES (Berlioz et Darlix, 1995; Berlioz *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1992; Vagner *et al.*, 1995b).

V. 1. b) La régulation des IRES

L'existence des IRES dans les ARNm cellulaires coiffés a posé la question de leur fonction physiopathologique (R. J. Jackson, 1991). Plusieurs études ont montré que les IRES des ARNm cellulaires sont tissu-spécifiques et/ou régulés par différents processus physiologiques tels que la différenciation cellulaire, la spermatogenèse ou la plasticité des neurones (Audigier *et al.*, 2008; Bernstein *et al.*, 1997; Conte *et al.*, 2009; Creancier *et al.*, 2001; Creancier *et al.*, 2000; Gonzalez-Herrera *et al.*, 2006). Plusieurs IRES sont aussi activés au cours de la mitose (Cornelis *et al.*, 2000; Pyronnet *et al.*, 2000). De récents rapports ont révélé que certains IRES sont activés de façon aberrante dans les cellules tumorales et sont donc impliqués dans la dérégulation de l'expression génique dans le cancer (Marcel *et al.*, 2013). De plus, l'activité des IRES cellulaires est stimulée en conditions de stress telles que l'apoptose et l'hypoxie, lorsque la traduction dépendante de la coiffe est bloquée (Bornes *et al.*, 2007; Braunstein *et al.*, 2007; Conte *et al.*, 2008; Damiano *et al.*, 2010; Holcik et Sonenberg, 2005; Morfoisse *et al.*, 2014). Certains d'entre eux sont d'ailleurs présents sur les ARNm de facteurs impliqués dans le processus de remodelage vasculaire mentionnés précédemment.

Régulation traductionnelle en conditions de stress

Dans les deux pathologies étudiées, les cellules sont sujettes à différents stress comme l'apoptose et l'hypoxie. Dans ces conditions, l'initiation de la traduction est inhibée de deux façons : le blocage de la voie mTOR qui affecte le recrutement du ribosome au niveau de la coiffe, et la phosphorylation d'eIF2- α qui empêche la formation de l'ARN de transfert initiateur chargé d'un résidu méthionine (Met-ARNt). La traduction IRES-dépendante n'est pas, quant à elle, perturbée par ces deux voies (Holcik et Sonenberg, 2005; Spriggs *et al.*, 2005; Thakor et Holcik, 2012).

Les IRES sont naturellement présents sur des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress. En particulier, un IRES est situé sur l'ARNm de HIF1 α , la clé de la réponse cellulaire à l'hypoxie qui induit la transcription de gènes contenant une séquence HRE dans leur promoteur (Lang *et al.*, 2002). Cet IRES permet que la traduction de HIF soit activée au cours de l'hypoxie malgré le blocage de la traduction globale (Braunstein *et al.*, 2007; Schepens *et al.*, 2005).

Comme il a été décrit précédemment, une conséquence importante de l'hypoxie est la stimulation de l'angiogenèse dans le but de générer de nouveaux vaisseaux capables de restaurer la demande cellulaire en oxygène. Étonnamment, les facteurs angiogéniques majeurs possèdent tous des IRES dans leurs ARNm : VEGFA (Akiri *et al.*, 1998; Huez *et al.*, 1998), FGF1 (Martineau *et al.*, 2004), FGF2 (Vagner *et al.*, 1995a).

L'expression de VEGFA, induite par HIF1 α au niveau transcriptionnel, est également renforcée au niveau traductionnel. Deux IRES sont présents sur son ARNm : l'IRES A et l'IRES B (Huez *et al.*, 1998). Ils présentent tous deux une faible activité au stade embryonnaire et dans les tissus adultes, cependant, ils permettent une traduction efficace en réponse à l'hypoxie, dans les tumeurs et dans le muscle ischémique (Bornes *et al.*, 2007; Braunstein *et al.*, 2007; Stein *et al.*, 1998). Contrairement à VEGFA, FGF2 n'est pas induit par l'hypoxie au niveau transcriptionnel mais son expression est augmentée au niveau traductionnel, par le biais de son IRES, *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'ischémie de la peau (Conte *et al.*, 2008). Le même phénomène a été observé pour le facteur lymphangiogénique majeur VEGFC, activé par l'hypoxie via un IRES dans les cellules tumorales métastatiques et les ganglions lymphatiques (Morfoisse *et al.*, 2014). L'activation de FGF2 et VEGFC se fait par un mécanisme indépendant de HIF1- α , ce qui révèle que les IRES fournissent une voie alternative de réponse à l'hypoxie.

Récemment, il a été démontré que le VEGFD, qui est impliqué dans la lymphangiogenèse, possède un IRES activé par choc thermique, dans les cellules tumorales (Morfoisse *et al.*, 2016). De plus, des travaux de l'équipe mettent en avant une activation de l'IRES de FGF1 et de FGF2 par l'hypoxie de façon précoce dans des cardiomyocytes HL-1, alors que les IRES de VEGFA, VEGFC et VEGFD s'activent plus tardivement (Hantelys et coll., en préparation).

L'activité des IRES peut varier entre différents types cellulaires, selon la présence et la disponibilité de facteurs qui se lient aux IRES, appelés ITAF (IRES trans-acting factor). Le mécanisme d'action des ITAF n'est pas entièrement compris : ils agissent comme protéines chaperonnes en changeant ou stabilisant la structure secondaire de l'IRES pour permettre par la suite à des protéines ou à la sous-unité ribosomale 40S de se lier, ou alors comme protéines qui servent d'ancrage à d'autres protéines ou à la sous-unité ribosomale 40S. L'activation de la traduction de HIF en hypoxie a lieu, par exemple, sous le contrôle de l'ITAF hnRNP I (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1 ou PTBP1, polypyrimidine tract-binding protein 1), aussi connue comme régulateur de différents IRES (Romanelli *et al.*, 2013; Schepens *et al.*, 2005). D'autres ITAFS ont été identifiés pour les IRES de facteurs de croissance : hnRNP A1 est un ITAF de FGF2 dans les cellules HeLa (Bonnal *et al.*, 2005), la nucléoline sert d'ITAF à l'IRES de VEGFD au cours de la lymphangiogenèse tumorale

(Morfoisse *et al.*, 2016) et la vasohibine agit comme un ITAF de l'IRES de FGF1 dans des cardiomyocytes HL-1 en hypoxie (Hantelys et coll., en préparation).

V. 1. c) L'IRES, un outil pour construire des vecteurs multicistroniques

L'initiation interne de la traduction dépendante des IRES rappelle le mécanisme d'initiation des procaryotes qui permet de traduire des ARNm polycistroniques (Pestova *et al.*, 1998; Pilipenko *et al.*, 1992). Cette observation a donné l'idée que de tels opérons pourraient être créés dans des eucaryotes en utilisant les IRES pour concevoir des vecteurs (Moss *et al.*, 1990). Une large majorité des vecteurs multicistroniques conçus à ce jour permet la co-expression de deux gènes sous le contrôle de deux promoteurs à partir d'un même vecteur. Cependant, une telle approche a révélé qu'un des deux gènes pouvait être éteint en dépit de l'expression de l'autre même s'il exprime un antibiotique (Allera-Moreau *et al.*, 2006). Ceci peut être le résultat d'une compétition entre les deux promoteurs ou une contre-sélection du gène d'intérêt s'il est toxique ou s'il inhibe la croissance cellulaire. Dans un tel contexte, les IRES ont été utilisés avec succès pour générer la co-expression de transgènes sous le contrôle d'un seul promoteur (Figure 5).

Le premier vecteur rétroviral tricistronique basé sur les IRES apparaît en 1992, fournissant un réel potentiel pour la thérapie génique (Morgan *et al.*, 1992). Ce vecteur co-exprime avec succès le gène de résistance NEO, l'adénosine désaminase et le gène rapporteur chloramphénicol acétyltransférase (CAT) en utilisant deux IRES de la famille des picornavirus, celui du poliovirus et celui du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV). Deux ans plus tard, un vecteur tricistronique thérapeutique exprimant les deux sous-unités de l'interleukine 12 avec la résistance NEO valide le concept de vecteurs à IRES pour co-exprimer deux sous-unités d'une protéine avec une stœchiométrie adéquate et un gène de résistance (Zitvogel *et al.*, 1994). Par la suite, des vecteurs bicistroniques ont été utilisés avec succès pour sélectionner des clones cellulaires exprimant une protéine d'intérêt avec un gène de résistance, évitant alors les problèmes générés par l'utilisation de deux promoteurs (Allera-Moreau *et al.*, 2006; Arnaud *et al.*, 1999).

La sensibilité des IRES à l'hypoxie ou à l'apoptose peut être un avantage pour la construction de vecteurs de transfert de gène dans l'ischémie du membre inférieur et l'insuffisance cardiaque, puisque l'expression du transgène sous le contrôle d'un IRES augmente en conditions ischémiques *in vivo*. Ces données de recherche fondamentale doivent être prises en compte dans la conception de cassettes d'expression optimisées. L'utilisation de vecteurs basés sur les IRES semble particulièrement adéquate pour la thérapie génique des

pathologies ischémiques. Il a été évoqué plus haut qu'une des difficultés de la thérapie angiogénique était d'établir un gradient de concentration entre la zone à traiter et le reste du corps ou de l'organe. Les IRES constituent une solution permettant une expression modérée dans les zones non ischémiques, et une expression plus soutenue dans la zone d'intérêt.

V. 2) La tissu-spécificité des IRES cellulaires

Les vecteurs à IRES développés jusqu'à maintenant, utilisent pour la plupart les IRES des picornavirus, en se basant sur la forte efficacité de ces IRES en transfection transitoire, comparé aux IRES d'ARNm cellulaires. Il a été observé que les IRES d'ARNm cellulaires présentent effectivement une faible efficacité dans les cellules transfectées transitoirement. Cela peut être le résultat d'une spécificité de l'activité des IRES cellulaires selon les cellules ou les tissus. Effectivement, l'activité de l'IRES de FGF2 varie avec le type cellulaire, la plus faible étant dans les fibroblastes et la plus forte dans les cellules de neuroblastome et d'ostéosarcome (Creancier *et al.*, 2000). Des variations similaires ont été observées pour d'autres types cellulaires (Créancier L. et Prats AC., résultats non publiés). La plus forte régulation des IRES cellulaires a été montrée *in vivo*, dans des souris transgéniques exprimant deux luciférases séparées de différents IRES. Clairement, l'IRES d'EMCV est actif dans la plupart des organes et tissus alors que l'IRES de FGF2 est très faible dans la majorité des organes exceptés les testicules et le cerveau où son activité augmente de 200 à 400 fois, et au moins 10 fois plus que l'activité de l'IRES d'EMCV (Creancier *et al.*, 2000). Un comportement similaire a été observé avec d'autres IRES cellulaires tels que les IRES de c-myc et VEGFA (Bornes *et al.*, 2007; Creancier *et al.*, 2001).

La tissu-spécificité des IRES cellulaires est utile pour contrôler l'expression des transgènes. Ils peuvent être considérés comme des activateurs traductionnels si l'on fait le parallèle avec les activateurs transcriptionnels en amont des promoteurs. Le concept de tissu-spécificité traductionnelle peut être appliqué au transfert de gène en couplant des IRES tissu-spécifiques avec des promoteurs tissu-spécifiques pour créer des vecteurs avec une sécurité accrue. Ce concept nous rappelle aussi que l'IRES d'EMCV n'est pas toujours le meilleur à utiliser. Une récente étude rapporte l'échec de l'expression du deuxième cistron d'un AAV bicistronique utilisant l'IRES d'EMCV, dans des neurones de Purkinje chez la souris (Bosch *et al.*, 2014).

L'avantage d'utiliser des IRES cellulaires a également été démontré pour le transfert de gène dans le muscle squelettique. L'IRES de FGF1 est aussi efficace que l'IRES d'EMCV dans le

muscle murin après électrotransfert d'un plasmide (Martineau *et al.*, 2004). De plus, quand l'IRES est utilisé dans un AAV bicistronique, son activité est supérieure à celle de l'IRES d'EMCV dans les myoblastes et permet une expression du transgène 10 fois plus efficace quand l'AAV est injectée dans le muscle murin (Delluc-Clavieres *et al.*, 2008). Une telle différence peut être due à la présence d'ITAF spécifiques de l'IRES de FGF1 ou cela peut provenir d'une plus faible capacité de l'IRES d'EMCV à maintenir une expression stable sur le long terme, comparé aux IRES cellulaires, comme cela a été montré dans une étude précédente (Allera-Moreau *et al.*, 2007).

Sur la base de ces différentes données, il peut être utile voire recommandé de choisir un IRES adéquat suivant le type cellulaire ou le tissu à cibler, plutôt que d'utiliser l'IRES d'EMCV.

V. 3) Applications biomédicales des IRES

V. 3. a) Applications précliniques

Depuis plusieurs années, les IRES ont trouvé des applications biomédicales. Comme mentionné plus haut, la première utilisation à but thérapeutique a été la co-expression des sous-unités de l'interleukine 12 avec un gène de résistance (Zitvogel *et al.*, 1994). Cependant, cette application n'est pas limitée aux gènes thérapeutiques composés de plusieurs sous-unités. De plus, l'utilisation d'un gène de résistance n'est pas recommandée pour les essais cliniques.

L'autre application des IRES provient du concept émergent de thérapie génique combinée. Plusieurs études ont démontré l'intérêt d'utiliser plusieurs facteurs pro-angiogéniques ou anti-angiogéniques dans les maladies cardiovasculaires et les cancers (Tableaux 3 et 4). Les IRES se présentent alors comme des outils très intéressants pour transférer plusieurs gènes tout en échappant aux problèmes d'inhibition d'un promoteur au profit de l'autre.

Le concept de vecteurs basés sur des IRES pour une thérapie génique combinée a été validé dans plusieurs pathologies, la première démonstration étant l'immunothérapie combinée du cancer en utilisant un rétrovirus tricistronique exprimant CD70 et CD80 (Couderc *et al.*, 1998). En plus de l'IRES d'EMCV, plusieurs IRES cellulaires ou viraux ont été testés avec succès dans cette approche (Douin *et al.*, 2004). *In vivo*, la thérapie génique avec des vecteurs à IRES a également été validée pour le traitement de l'ischémie du membre inférieur dans un modèle murin, à la suite de l'injection intramusculaire et l'électrotransfert d'un plasmide contenant l'IRES de FGF1 pour la co-expression de FGF2 et Cyr61 (Rayssac *et al.*, 2009) (Tableau 4). Cette étude a montré que les deux facteurs angiogéniques, bien

qu'exprimés à plus faibles doses par le vecteur bicistronique que par les vecteurs monocistroniques, ont un effet synergique sur la stimulation de l'angiogenèse thérapeutique, rendant la construction bicistronique plus efficace. De plus, grâce aux faibles doses de molécules thérapeutiques, le vecteur bicistronique n'induit aucun effet indésirable sur l'angiogenèse tumorale, contrairement au vecteur exprimant de fortes quantités de Cyr61. La thérapie génique combinée utilisant des vecteurs basés sur des IRES est donc aussi une approche thérapeutique plus sûre.

Par la suite, d'autres études ont confirmé le succès de ces vecteurs dans le traitement de l'ischémie du membre chez la souris avec un AAV exprimant VEGFA et BMP7 (bone morphogenetic protein 7) séparés par l'IRES d'EMCV (C. Zhang *et al.*, 2010) ou exprimant VEGFA et FGF4, également séparés par l'IRES d'EMCV (Jazwa *et al.*, 2013) (Tableau 4).

La thérapie génique combinée du cancer a aussi été rapportée en utilisant des vecteurs avec des IRES co-exprimant IL-12 et CD80, les facteurs anti-angiogéniques angiostatine et endostatine, ou CXCL4L1 et fibstatine (Isayeva *et al.*, 2005; Z. H. Li *et al.*, 2003; A. C. Prats *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2001) (Tableau 4). De plus, la combinaison de l'angiostatine et l'endostatine dans un vecteur à IRES a réussi à traiter la dégénération maculaire liée à l'âge dans un modèle murin (Kachi *et al.*, 2009). Toujours dans le domaine des maladies dégénératives, les souris atteintes de mucopolysaccharidose de type IIIA présymptomatique ont été traitées avec succès par un AAV co-exprimant SGSH (N-sulfoglycosamine sulfohydase) et SUMF1 (sulfatase-modifying factor 1) (Winner *et al.*, 2016) (Tableau 4). Un essai clinique de phase I/II a été effectué avec ce même vecteur (Tardieu *et al.*, 2014).

Une seule étude a obtenu de meilleurs résultats avec deux vecteurs AAV séparés qu'avec un vecteur bicistronique avec un IRES, pour administrer FGF14 et une protéine fluorescente dans des neurones de Purkinje (Bosch *et al.*, 2014). Cette étude a utilisé l'IRES d'EMCV qui est pourtant fonctionnel dans les neurones (Derrington *et al.*, 2005). Cependant, cela souligne que cet IRES n'est pas très actif dans les neurones *in vivo*, en comparaison à l'IRES de FGF2 qui est au moins dix fois plus actif (Audigier *et al.*, 2008; Creancier *et al.*, 2000). Dans un tel cas, on peut s'attendre à ce que le choix de l'IRES de FGF2 fournisse de meilleurs résultats.

Un vecteur porteur de trois gènes thérapeutiques séparés par des IRES a été utilisé comme traitement de la maladie de Parkinson. En effet, un lentivecteur tricistronique exprimant trois protéines catécholaminergiques, Prosavin, a été administré dans des rats, permettant d'importants bénéfices thérapeutiques (Azzouz *et al.*, 2002; H. J. Stewart *et al.*, 2011) (Tableau 4).

Tableau 4 : Etudes précliniques de thérapie génique combinée utilisant des vecteurs multicistroniques

Pathologies	Gènes thérapeutiques	Modèle animal	IRES	Type de vecteur	Référence
Cancers					
Fibrosarcome	CD70 + CD80	Souris	EMCV	Rétrovirus	(Couderc <i>et al.</i> , 1998)
Mélanome	Angio-endo fusion	Souris	Aucun (fusion)	Rétrovirus	(Scappaticci <i>et al.</i> , 2001)
Myélome multiple	Sous-unités IL-12 + CD80	Souris	EMCV + FMDV	Rétrovirus	(Z. H. Li <i>et al.</i> , 2003; Wen <i>et al.</i> , 2001)
Mélanome	CD70 + CD80	Souris	EMCV, c-myc, FGF2, HTLV1	Rétrovirus	(Douin <i>et al.</i> , 2004)
Cancer ovarien	Angiostatine + endostatine	Souris	EMCV	AAV2	(Isayeva <i>et al.</i> , 2005)
Cancer de la tête et du cou	Angio-endo fusion	Souris	Aucun (fusion)	Virus de la vaccine	(Tysome <i>et al.</i> , 2011)
Cancer du pancréas	CXCL4L1 + fibstatine	Souris	FGF1	AAV1/2, Lentivecteur	(A. C. Prats <i>et al.</i> , 2013)
Maladies cardiovasculaires					
Ischémie du membre	FGF2 + Cyr 61	Souris	FGF1	Plasmide	(Rayssac <i>et al.</i> , 2009)
Ischémie du membre	VEGFA + BMP7	Lapin	EMCV	AAV	(C. Zhang <i>et al.</i> , 2010)
Ischémie du membre	VEGFA + FGF4	Souris	EMCV	AAV2	(Jazwa <i>et al.</i> , 2013)
Ischémie cardiaque	GATA4 + MEF2C + TBX5	Rat	Aucun (peptide 2A)	Lentivecteur	(Mathison <i>et al.</i> , 2014)
Maladies neurodégénératives					
Parkinson	TH + AADC + CH1	Rat	EMCV	Lentivecteur	(Azzouz <i>et al.</i> , 2002) (H. J. Stewart <i>et al.</i> , 2011)
dégénération maculaire liée à l'âge	Angiostatine + endostatine	Souris	EMCV	Lentivecteur	(Kachi <i>et al.</i> , 2009)
Mucopolysaccharidose de type IIIA	SGSH + SUMF1	Souris	EMCV	AAV	(Winner <i>et al.</i> , 2016)
Autre pathologie					
Fibrose hépatique	FOXA3 + GATA4 + HNF1a + HNF4a	souris	Aucun (peptide 2A)	Vecteur adénoviral	(Song <i>et al.</i> , 2016)

V. 3. b) Applications cliniques

Toutes les études précliniques mentionnées ci-dessus montrent que les vecteurs basés sur des IRES représentent un outil intéressant pour être utilisé en thérapie génique combinée au niveau clinique. Néanmoins, très peu d'essais cliniques avec de tels vecteurs ont été effectués. Le premier à être cité est l'injection de rétrovirus tricistronique exprimant IL-12, qui a permis la diminution significative de la taille des tumeurs chez quelques patients avec un mélanome ou un cancer de la tête ou du cou, mais de nombreux effets indésirables ont été observés ce qui a engendré un arrêt prématuré de la phase II (Lotze *et al.*, 1996; Tahara *et al.*, 1995).

Un vecteur bicistronique avec un IRES, co-exprimant VEGFA₁₆₅ et FGF2, a été utilisé en clinique pour la thérapie génique de patients avec une maladie coronarienne réfractaire (Kukula *et al.*, 2011) (Tableau 5). Le protocole correspond au transfert intramyocardique d'un plasmide exprimant la cassette bicistronique. Cette étude n'a pas montré d'amélioration de la perfusion, mais les patients traités ont présenté une amélioration des symptômes cliniques et de la tolérance à l'exercice. De plus, cet essai a permis de montrer que le transfert de vecteurs bicistroniques ne pose pas de problèmes de sécurité. Le bénéfice modéré, bien qu'encourageant, peut être dû à l'utilisation d'un plasmide qui ne permet pas une expression à long terme, contrairement à certains vecteurs viraux, et également au choix de l'IRES d'EMCV qui n'est pas optimal pour l'expression génique en conditions hypoxiques (Bornes *et al.*, 2007; Morfousse *et al.*, 2014).

Récemment, deux essais cliniques de thérapie génique ont utilisé avec succès des vecteurs viraux multicistroniques avec l'IRES d'EMCV (Tableau 5). Le premier est l'essai de phase I/II sur des patients atteints de mucopolysaccharidose de type IIIA, mentionné ci-dessus (Tardieu *et al.*, 2014). Quatre enfants ont reçu des injections intracérébrales du vecteur AAV SGSH-IRES-SUMF1. L'évaluation neurocognitive suggère un bénéfice cognitif sur le patient le plus jeune, alors que les autres se sont stabilisés. De plus, après un an, il a été observé que le traitement était sûr et bien toléré. Cela valide alors l'approche chirurgicale d'une administration directe d'AAV dans le parenchyme cérébral. Le deuxième essai de phase I/II concerne 15 patients avec la maladie de Parkinson. Le lentivecteur tricistronique, Prosavin (décrit plus haut), a été administré par voie intrastriatale (Palfi *et al.*, 2014). Une amélioration significative des scores moteurs a été enregistrée chez tous les patients après six mois. C'est la première utilisation chez l'homme d'un lentivecteur pour une maladie neurodégénérative. Ces études valident l'utilisation clinique de vecteurs viraux avec un IRES.

Tableau 5 : Etudes cliniques de thérapie génique combinée

Pathologies	Gènes thérapeutiques	IRES	Type de vecteur	Résultats	Référence
Ischémie cardiaque	VEGFA + FGF2	EMCV	Plasmide	Bénéfices modérés	(Kukula <i>et al.</i> , 2011)
Parkinson	TH + AADC + CH1	EMCV	Lentivecteur	Bénéfices pour 15/15 patients	(Palfi <i>et al.</i> , 2014)
Mucopolysaccharidose de type IIIA	SGSH + SUMF1	EMCV	AAV	Bénéfices pour 1 patient Stabilisation pour 3/4	(Tardieu <i>et al.</i> , 2014)

V. 4) Des alternatives aux IRES pour des vecteurs multicistroniques

Les vecteurs avec des IRES ne sont pas la seule approche pour co-exprimer plusieurs gènes sous le contrôle d'un seul promoteur. La première alternative est la fusion de gènes. Cela a été utilisé avec succès pour combiner l'angiostatine et l'endostatine dans le traitement du mélanome, et des cancers de la tête et du cou (Scappaticci *et al.*, 2001; Tysome *et al.*, 2011) (Tableau 4). Cette technique a l'avantage d'être simple, puisqu'elle ne nécessite pas d'inclure des séquences intermédiaires. Mais les inconvénients sont la possibilité de perdre ou réduire l'activité d'une ou des protéines fusionnées, et la difficulté rencontrée lorsque les protéines doivent agir dans des compartiments différents.

Une deuxième alternative est l'utilisation de l'épissage alternatif. Une telle approche a été proposée, il y a déjà plusieurs années, avec des vecteurs rétroviraux, en utilisant la caractéristique naturelle d'épissage alternatif du génome des rétrovirus (Cepko *et al.*, 1984; Korman *et al.*, 1987). Plus récemment, ce concept a été utilisé pour co-exprimer deux chaînes immunoglobulines (Fallot *et al.*, 2009). L'intérêt de ce système est la possibilité d'adapter le ratio des deux transgènes en mutant les sites d'épissage. Cependant, une des limites de ce système est que l'efficacité du site d'épissage et par conséquent le ratio des deux protéines d'intérêt est influencé par la présence d'exons activateurs ou inhibiteurs de l'épissage dans les séquences des transgènes. En d'autres termes, avec un même site d'épissage, si les gènes changent, le ratio sera également différent. Cela empêche donc la conception de vecteurs avec un ratio stable applicable à la co-expression de n'importe quelle paire de protéines thérapeutiques.

Un troisième système très intéressant est fourni par les peptides 2A. Parmi eux, se trouvent le F2A dérivé du foot-and-mouth disease virus, l'E2A (equine rhinitis A virus), le P2A (porcine teschovirus-1) et le T2A (thosa asigna virus). Leurs séquences comprennent entre 18 et 24 acides aminés. Contrairement à ce qu'il a longtemps été admis, les peptides 2A ne catalysent pas le clivage des protéines, mais ils catalysent la terminaison de la traduction en absence de codon stop, suivi par une réinitiation. Ils sont couramment utilisés comme outils pour co-exprimer deux protéines séparées, ou plus, à partir d'un seul ORF (open reading frame) (de Felipe *et al.*, 2006). Les peptides 2A constituent donc une alternative aux IRES ; leur taille est petite en comparaison, ce qui permet la conception de vecteurs viraux avec plusieurs gènes d'intérêt. Ainsi, les peptides P2A, T2A et F2A ont été utilisés pour construire une cassette exprimant quatre facteurs de transcription (FOXA3, GATA4, HNF1a et HNF4a) (Song *et al.*, 2016) (Tableau 4). Cette cassette insérée dans un lentivecteur a permis la conversion de myofibroblastes murins en cellules avec un phénotype d'hépatocytes *in vitro*. Cette même cassette a ensuite été intégrée dans un vecteur adénoviral favorisant alors la conversion *in vivo* des myofibroblastes pro-fibrogènes en cellules de type hépatocytes réduisant ainsi la fibrose hépatique. De même, un lentivecteur exprimant les gènes GATA4, MEF2C et TBX5 séparés par des peptides 2A a été injecté chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde (Mathison *et al.*, 2014). Ce vecteur tricistronique a permis d'améliorer la fonction ventriculaire, et ce, plus efficacement que les trois vecteurs exprimant chacun un des gènes thérapeutiques (Tableau 4).

Cependant, les peptides 2A ne fonctionnent pas dans tous les systèmes. Par exemple, dans l'étude sur les neurones de Purkinje mentionnée ci-dessus, un peptide 2A a été utilisé mais n'a pas fonctionné, ce qui a engendré un plus long ORF plutôt que les deux protéines attendues (Bosch *et al.*, 2014). Dans un autre rapport comparant les constructions bicistroniques exprimant Sox9 et EGFP séparés par l'IRES d'EMCV ou le peptide F2A, les auteurs ont détecté 42% de protéines fusionnées, reflétant une inefficacité du mécanisme permettant le saut du ribosome (Chan *et al.*, 2011). La formation de telles protéines de fusion a souvent lieu avec des protéines porteuses de séquence signal N-terminale (de Felipe *et al.*, 2010). Une étude récente a comparé l'efficacité des quatre peptides 2A pour cliver deux protéines, et aucun d'entre eux ne permet 100% de clivage (Chng *et al.*, 2015). Ils ont montré également que l'ajout d'une séquence linker GSG en amont favorise l'efficacité sans pour autant atteindre un clivage complet.

De plus, aucune information n'est disponible quant à la tissu-spécificité des peptides 2A, ou au comportement en réponse à un stress, contrairement aux IRES.

Beaucoup d'études ont montré que la thérapie génique combinée est une approche attractive dans les modèles animaux. Cette observation a justifié des recherches extensives sur l'optimisation de vecteurs capables d'exprimer plusieurs protéines. Dans le contexte des pathologies cardiovasculaires ischémiques, les vecteurs à IRES montrent un réel potentiel pour générer des bénéfices thérapeutiques et sans effet néfaste. En plus d'être capables de co-exprimer plusieurs molécules thérapeutiques, les IRES permettent des effets synergiques à plus faible dose. De par leur tissu-spécificité et leur activation en réponse au stress, ils amènent de prometteuses perspectives dans l'amélioration des vecteurs, ce qui peut améliorer l'efficacité de la thérapie génique.

Objectifs

En dépit des avancées considérables dans les traitements pharmacologiques et chirurgicaux de l'ischémie critique des membres inférieurs et de l'insuffisance cardiaque ischémique, ces pathologies demeurent un problème majeur de santé publique. La thérapie génique angiogénique est apparue comme une approche attractive pour restaurer la perfusion du tissu ischémique alors que le transfert de gènes non angiogéniques permet de rétablir la fonction contractile cardiaque. Cependant la thérapie génique utilisant un seul gène thérapeutique a produit jusque là des résultats modestes en clinique; la thérapie combinée apparaît alors comme une stratégie plus prometteuse. L'efficacité de la thérapie génique nécessite des vecteurs de transfert de gènes optimisés, notamment pour fonctionner dans des conditions de stress.

L'objectif de ma thèse a été de développer des vecteurs multicistroniques pour une thérapie combinée en utilisant l'IRES de FGF1, connu pour sa forte activité dans le muscle, et d'appliquer ces vecteurs à deux pathologies, l'ischémie du membre et l'ischémie myocardiques.

La première partie de mes travaux a tout d'abord reposé sur l'étude de la régulation de cet IRES au cours de la différenciation myoblastique et sur l'identification d'ITAF et de leur rôle dans ce processus.

Dans un deuxième volet, j'ai étudié le rôle du transfert d'une cassette bicistronique exprimant FGF2 et Cyr61, séparé de l'IRES de FGF1 sur la revascularisation après ischémie critique du membre inférieur, dans des souris BALB/c caractérisées pour leur sensibilité à l'ischémie associée à une faible capacité à reperfuser le membre ischémique. Dans le but de comparer l'expression du transgène à court et long terme, la cassette bicistronique a été transférée dans un vecteur AAV. Le potentiel thérapeutique de ce vecteur viral a été analysé à différents temps d'injection, avant ou après chirurgie pour démontrer l'importance du moment de l'administration du traitement.

La troisième étape, qui est le cœur de ma thèse, a été de développer une série de lentivecteurs mono-, bi- et tricistroniques exprimant des facteurs pro-angiogéniques et cardioprotecteurs séparés de l'IRES de FGF1 : apeline, FGF2 et SERCA2a. J'ai étudié l'activité de l'IRES de FGF1 dans le cœur de souris en insuffisance cardiaque ischémique après infarctus du myocarde, puis l'effet des vecteurs thérapeutiques exprimant apeline, FGF2 et/ou SERCA2a sur l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, la fonction cardiaque, et le remodelage.

Finalement, face aux effets bénéfiques sur le remodelage post-ischémique de la thérapie cellulaire à partir de cellules souches mésenchymateuses, et à l'importance d'un pré-conditionnement de ces cellules et de leur effet paracrine, j'ai cherché à combiner la thérapie cellulaire avec la thérapie génique, c'est à dire à réaliser une thérapie génique *ex vivo* avec des cellules souches mésenchymateuses transduites par des lentivecteurs porteurs de différentes combinaisons des gènes *apeline*, *FGF2* et *Cyr61*, trois protéines pro-angiogéniques sécrétées. L'injection de ces cellules modifiées génétiquement pourrait permettre d'augmenter leur survie dans un environnement hypoxique et de stimuler leur pouvoir pro-angiogénique dans le but de traiter l'insuffisance cardiaque et l'ischémie critique du membre inférieur chez le rat.

L'objectif à moyen et long terme de ce travail de thèse serait d'injecter le vecteur viral optimal ou les CSM modifiées dans le myocarde ou dans le muscle squelettique dans des modèles de plus gros animaux, dans la perspective d'élaborer un essai clinique pour une des deux pathologies concernées (ischémie myocardique ou du membre) en collaboration avec des cardiologues et des chirurgiens vasculaires de l'hôpital de Rangueil.

Résultats

Chapitre 1

Traduction promoteur-dépendante de l'IRES de FGF1 contrôlée par p54^{nrb} et hnRNPM au cours de la différenciation des myoblastes

Le facteur de croissance fibroblastique FGF1 est induit au cours de la différenciation myoblastique, au niveau transcriptionnel et traductionnel. La transcription de ce facteur se fait uniquement à partir d'un de ses quatre promoteurs, le promoteur A, dans le processus de myogenèse. Cependant, le mécanisme classique de traduction à partir de la coiffe est bloqué durant les premières étapes de la différenciation des myoblastes (Conte *et al.*, 2009). L'IRES A (internal ribosome entry site), présent en 5' de l'ARNm transcrit à partir du promoteur A, permet alors la traduction de FGF1 de façon cap-indépendante (Martineau *et al.*, 2004). Il a été précédemment montré que l'activité de l'IRES A est considérablement augmentée lorsque la transcription se fait à partir du promoteur A, comparé au promoteur CMV (Conte *et al.*, 2009). FGF1 est donc induit par un mécanisme de couplage transcription-traduction dont nous avons cherché à élucider le mécanisme dans le présent travail.

Nous avons donc développé une nouvelle approche pour identifier des ITAF capables de contrôler la traduction de l'ARNm FGF1, ces derniers étant inconnus. L'analyse d'interactions biomoléculaires nommée BIA (biomolecular interaction analysis) utilise le phénomène de résonance de surface pour caractériser les interactions macromoléculaires et a été optimisé pour identifier les molécules interagissant par couplage de la technique de BIA avec la spectrométrie de masse (MS).

Ainsi, nous avons pu identifier deux protéines hnRNPM et p54^{nrb}/NONO se fixant au promoteur A et à l'IRES A du FGF1. Nous avons inactivé ou surexprimé ces protéines dans des myoblastes murins transfectés par un plasmide bicistronique exprimant deux luciférases séparées de différents IRES (IRES A de FGF1, EMCV, FGF2 ou hairpin) sous le contrôle de différents promoteurs (promoteur A de FGF1, CMV, ou promoteur A muté). Nous avons ainsi pu démontrer que P54 et hnRNPM sont deux ITAF contrôlant la traduction dépendante de l'IRES A de FGF1 au cours de la différenciation des myoblastes et que ce mécanisme est dépendant du promoteur. En conséquence, l'induction de FGF1 endogène et la formation des myotubes ne peuvent se faire qu'en présence de hnRNPM et p54^{nrb}/NONO.

Ce travail met en évidence un couplage des mécanismes de transcription et de traduction de FGF1 en présence de ces deux ITAFS.

RESEARCH ARTICLE

Promoter-Dependent Translation Controlled by p54^{nrb} and hnRNPM during Myoblast Differentiation

Nadera Ainaoui^{1*}, Fransky Hantelys^{1*}, Edith Renaud-Gabardos^{1*}, Morgane Bunel¹, Frédéric Lopez², Françoise Pujol¹, Rémi Planes³, Elmostafa Bahraoui³, Carole Pichereaux⁴, Odile Burlet-Schiltz⁴, Angelo Parini⁵, Barbara Garmy-Susini⁵, Anne-Catherine Prats^{1*}

1 TRADGENE, UPS (EA4554), Toulouse, France, **2** UMR U1037-CRCT, Inserm, UPS, Toulouse, France, **3** UMR U1043-CPTP, Inserm, UPS, Toulouse, France, **4** UMR U5282-IPBS, CNRS, UPS, Toulouse, France, **5** UMR U1048-I2MC, Inserm, UPS, Toulouse, France

* These authors contributed equally to this work.

* Angelo-Parini@inserm.fr



OPEN ACCESS

Citation: Ainaoui N, Hantelys F, Renaud-Gabardos E, Bunel M, Lopez F, Pujol F, et al. (2015) Promoter-Dependent Translation Controlled by p54^{nrb} and hnRNPM during Myoblast Differentiation. PLOS ONE 10(9): e0136466. doi:10.1371/journal.pone.0136466

Editor: Yoon Ki Kim, Korea University, REPUBLIC OF KOREA

Received: April 17, 2015

Accepted: August 4, 2015

Published: September 2, 2015

Copyright: © 2015 Ainaoui et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work has been funded by Association Française contre les Myopathies (grant 19986), Association pour la Recherche sur le Cancer (grant PJA-20131203230), Ligue pour la Recherche Contre le Cancer, Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Institut National du Cancer (grant RBOCAN no. 2008-039), Fondation de l'Avenir (grant ET0-583), Région Midi-Pyrénées (grant 11052677), Fonds Européen du Développement Régional (grant REFBIO-VENT). There was no commercial funder. The funders had no

Abstract

Fibroblast growth factor 1 (FGF1) is induced during myoblast differentiation at both transcriptional and translational levels. Here, we identify hnRNPM and p54^{nrb}/NONO present in protein complexes bound to the FGF1 promoter and to the mRNA internal ribosome entry site (IRES). Knockdown or overexpression of these proteins indicate that they cooperate in activating IRES-dependent translation during myoblast differentiation, in a promoter-dependent manner. Importantly, mRNA transfection and promoter deletion experiments clearly demonstrate the impact of the FGF1 promoter on the activation of IRES-dependent translation via p54^{nrb} and hnRNPM. Accordingly, knockdown of either p54 or hnRNPM also blocks endogenous FGF1 induction and myotube formation, demonstrating the physiological relevance of this mechanism and the role of these two proteins in myogenesis. Our study demonstrates the cooperative function of hnRNPM and p54^{nrb} as regulators of IRES-dependent translation and indicates the involvement of a promoter-dependent mechanism.

Introduction

Gene expression in eukaryotes is regulated at multiple levels. Transcription, as well as post-transcriptional processes such as mRNA splicing, polyadenylation, degradation and translation, require a wide range of multi-component cellular machines in order to finely control protein production. For a long time, these steps have been considered to be a simple linear assembly line. Then, it has become apparent that gene expression, including steps such as transcription, capping, splicing, polyadenylation, RNA export and degradation, is coordinated in a complex and extensively coupled network [1, 2]. However, coordination resulting from the co-transcriptional loading of mRNA processing proteins by the C-terminal domain of RNA polymerase II seemed to exclude translational regulatory complexes [3].

role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

The fibroblast growth factor 1 (FGF1) gene provides an attractive system to decipher a mechanism of coupling between transcription and translation. Indeed, we have shown that this growth factor is induced by a transcription-translation coupling mechanism during myoblast differentiation [4]. The FGF1 gene structure has been well documented in human. Transcription occurs from four promoters A, B, C and D, which are either tissue specific or inducible [5, 6]. Promoters A, B and C are conserved in mouse [3]. The promoter A is active in heart, skeletal muscle and kidney while the promoter B is brain specific [4, 7]. Promoters C and D are inducible and considered as markers of cell proliferation [8–10]. The only FGF1 promoter to be activated during myoblast differentiation is the promoter A whereas the other promoters remain silent [4].

Transcription from each promoter generates alternative splicing of exon 1, leading to four mRNAs with distinct 5' untranslated regions (5'UTR), each of them expressing the same protein, FGF1. Two of these 5' UTRs contain internal ribosome entry sites (IRES) [11]. IRESs have been described in several mRNAs containing long structured 5' UTRs. Most of these mRNAs code for proteins involved in the control of gene expression [12]. IRES structures have been determined in several mRNAs by chemical and enzymatic methods, allowing identification of stem loops responsible for the IRES activity [11, 13, 14]. As regards the FGF1 IRES, the IRES structural domain is conserved in mammals [15]. However this IRES structure is different from the IRES structures found in other mRNAs. In particular, it clearly differs from the IRES structure of another member of the FGF family, FGF2, suggesting distinct regulations of these growth factors by the IRES-dependent mechanism [13]. IRES-mediated translation is involved in the major translational process in conditions when the classical mechanism of cap-dependent translation is blocked [14–16]. We have previously shown that FGF1 is translationally induced via the IRES present in the promoter A transcribed mRNA, while cap-dependent translation is blocked during the first steps of myoblast differentiation [4]. FGF1 IRES-mediated translation is concomitant with transcriptional activation at promoter A. Furthermore IRES activity is drastically enhanced when transcription is controlled by promoter A, compared to the cytomegalovirus (CMV) promoter [4].

The concept of a nuclear event governing formation of the "IRESome", the ribonucleoprotein complex responsible for activation of IRES-dependent translation, has been reported in the literature for c-myc and Smad1 IRESs, although the cell factors responsible for this process have not been identified [17, 18]. Furthermore, most ITAFs are nuclear proteins primarily identified as splicing regulators. The first to be identified, pyrimidine tract binding protein (PTB), was described as an intron-binding protein before being characterized as an ITAF of encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES [19, 20]. Several years after being identified as an ITAF for EMCV IRES, PTB has been shown to control several cellular IRESs such as APAF-1, BAG-1 or Bip [21–23]. Other splicing regulators, such as hnRNPK, hnRNPC1/2, hnRNPA1 or RBM4, have been identified as ITAFs [24–28]. HnRNPA1 has been described as an ITAF of several IRESs including FGF2, XIAP and c-myc IRESs [24, 29, 30]. It has been recently shown that this ITAF couples nuclear export and translation of several IRES-containing mRNAs [31].

Although the FGF1 IRES A has been reported to be stimulated during myoblast differentiation and muscle regeneration, nothing was known about ITAFs responsible for such regulation [4]. Biomolecular interaction analysis (BIA) uses a surface plasmon resonance phenomenon to characterize macromolecular interactions and has been recently optimized to enable the recovery and identification of interacting molecules by coupling BIA with mass spectrometry (MS) [32]. BIA-MS has proven successful in the identification of the partners in protein-protein interactions as it provides a high sensitivity compared to classical affinity chromatography approaches and permits identification from small quantities of bound ligands. A very reproducible "microelution" is now possible with the BIACORE 3000 instruments. This novel

technology was selected in the present study to search for proteins bound to the FGF1 promoter A and IRES A during myoblast differentiation to find candidate ITAFs and transcription factors involved in the transcription-translation coupling mechanism.

In the present report, we identified hnRNP and $p54^{nrb}$ /NONO bound (directly or indirectly) to FGF1 promoter A and IRES A in differentiating myoblasts (C2C12). Knockdown and overexpression approaches revealed that $p54^{nrb}$ and hnRNP are required to activate the IRES-dependent translation in a promoter-dependent manner. Furthermore, $p54^{nrb}$ and/or hnRNP knockdown inhibited myotube formation. Altogether, this study identifies a novel regulation of FGF1 gene expression, implying a cooperation between promoter and translational regulators to promote the time controlled process of myoblast differentiation.

Materials and Methods

Plasmids

The bicistronic plasmids with the CMV promoter and FGF1 IRES A (pCRF1AL2) or EMCV IRES (pCREL2), with the FGF1 promoter A and IRES A (pP1ARF1AL2) were previously described [4]. Human hnRNP4 and $p54^{nrb}$ cDNAs were the gifts of M. Swannson and A. Krainer, respectively. cDNAs were PCR-amplified and introduced into the pTRIP-DU3-MCS vector (pTRIP- $p54$ and pTRIP-HM) [33–35]. The bicistronic vector pTRIP- $p54$ HM contains the two cDNAs separated by the FGF1 IRES. Plasmid construction details are available upon request.

Cell culture and transfection

C2C12 myoblasts (European Collection of Cell Culture ECACC No 91031101) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 20% fetal calf serum in 100-mm diameter dishes at 37°C with 5% CO₂. For differentiation, cells were changed into fusion medium (DMEM with 5% horse serum). Transient transfections were performed in 6-well dishes using 1 µg plasmid with FuGene-6 (Biochemicals) and OptiMEM (Gibco-BRL, Invitrogen).

Small interference RNAs were from Thermoscientific ONE TARGET plus SMARTpool targeting hnRNP M (siM) cat L-013452-01 lot 100508 or $p54$ cat L-007756-01 lot 100809 (sip54) or siGENOME non-targeting siRNA (sic). Only in siF0, different siRNAs were used: siM-2 (5'-CAUUGGAAUUGGAAACCUATT-3') and sip54-2 (5'-GCUGAAUUGGUCCAAAUATT-3') (Sigma). C2C12 cells were transfected with 50nM siRNA with Hyperfect transfection reagent (Qiagen). mRNA transfection, were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations, with 2µg of each bicistronic mRNA. Cells were incubated at 37°C for 12h before harvesting and analysis.

Cell fractionation

C2C12 cells on 14 cm culture dishes were rinsed twice in cold phosphate-buffered saline (PBS 1X). Cells were scraped with a rubber policeman in 1 ml PBS 1X and pelleted by centrifugation at 2500 g for 10 min at 4°C. The pellet was resuspended in the 400 µl buffer A (10 mM HEPES pH7.9; 10 mM KCl; 0.1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1X proteases inhibitors). The cells were allowed to swell on ice for 15 min. 25 µl the buffer B (100 mM HEPES; 100 mM KCl; 10 mM EGTA; 500 mM MgCl₂; 10% NP40) was added and the tube was vigorously vortexed for 10 sec. The homogenate was centrifuged for 30 sec; the supernatant containing cytoplasmic extract was recovered. The nuclear pellet was resuspended in 50 µl the ice-cold buffer C (20 mM HEPES, 400 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1% proteases inhibitors) and vigorously rocked at 4°C.

for 15 min on a shaking platform. The nuclear extract was centrifuged for 5 min at 4°C and the supernatant recovered.

Preparation of biotinylated RNA and DNA, and of capped and polyadenylated mRNA

The FGF1 5'UTR cDNA containing the IRES A sequence obtained by PCR was cloned in the pCR4Blunt-TOPO plasmid (Invitrogen) downstream the T3 sequence [11]. The IRES T3 promoter fragment was cut with NcoI and transcription was performed with the MEGAscript T3 (Ambion), as per the manufacturer's protocol, in the presence of UTP-16-biotin (Roche Diagnostics GmbH), and the newly synthesized RNA was purified using an RNeasy column (Qiagen). The FGF1 promoter A was amplified from the bicistronic plasmid pP1AF1A12 with the 3' biotin primers purchased from Invitrogen [4]: primer 5'biotin forward: 5'agcttagtgag-gagccttcca-3', reverse: 5'accctgaaggcagatgtgg-3'.

The purification PCR products were performed by the Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel).

Capped and polyadenylated bicistronic mRNAs containing the FGF-1 IRES-A or the EMCV IRES were obtained using as templates PCR fragments amplified from bicistronic plasmids pCRF1A12 and pCREL2, respectively, using primers (oligo(dT)) included in the 3' primer purchased from Sigma [4]. Transcription in vitro was performed with mMessage mMachine T3 Ultra kit (Ambion) according to the manufacturer's recommendations.

BIA-MS experiments

SPR experiments were performed on a Proteon XPR36 (Biorad) and BIAcore 3000 (GE Healthcare) apparatus. The biotinylated targets RNA and DNA were immobilized on NLC sensorchip (Biorad) or carboxymethylated dextran sensor chips coated with streptavidin (SA sensorchip BIAcore) prepared according to the manufacturer's instructions. All RNA and DNA samples were prepared in HBS-EP buffer (0.01 M HEPES, pH 7.4; 15 M NaCl; 3 mM EDTA; 0.005% 20 surfactant). The proteins were injected at 20 μ L/min at 20°C, at 500 μ g/mL concentration across the sensor surface in this buffer. The regeneration of the RNA or DNA coated surface was achieved at 90 sec with a solution (20mM TEA; 0.5 M Urea).

Eluted protein samples (6 μ L) were digested by the addition of 10 μ L of a solution of modified trypsin in 25 mM NH_4HCO_3 (20 ng/ μ L, sequence grade, Promega) at 37°C for 4h. The peptides mixtures were analyzed by nanoLC-MS/MS using a nanochromatography system (Ultimate, Dionex) coupled to a Q-Star (Applied Biosystems, Altringham, USA) or an LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer. Five microliters of each sample were loaded on a C18 precolumn (300 μ m inner diameter x 5 mm; Dionex) at 20 μ L/min in 5% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid. After 5 min of desalting, the precolumn was switched on line with the analytical C18 column (75 μ m inner diameter x 15 cm; PepMap C18, Dionex) equilibrated in 95% solvent A (5% acetonitrile, 0.2% formic acid) and 5% solvent B (80% acetonitrile, 0.2% formic acid). Peptides were eluted using a 5–50% gradient of solvent B during 80 min at a 300 nL/min flow rate. The mass spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode. MS spectra were acquired on the 300–2000 m/z range and the three most intense ions were then selected for CID fragmentation. Dynamic exclusion was used within 60 s to prevent repetitive selection of the same peptide.

Database search and data analysis

The Mascot Daemon software (version 2.3.2, Matrix Science, London, UK) was used to perform database searches in batch mode with all the raw files acquired on each sample. Data

were searched against all entries in the SwissProt Human Mouse_20090127 protein database (36322 sequences; 19974433 residues). Oxidation of methionine was set as a variable modification for all Mascot searches. Specificity of trypsin digestion was set for cleavage after Lys or Arg except before Pro, and one missed trypsin cleavage site was allowed. The mass tolerances in MS and MS/MS were set to 5 ppm and 0.6 Da, respectively. Mascot results were parsed with the in-house developed software Mascot File Parsing and Quantification (MFPaQ) version 4.0 and protein hits were automatically validated if they satisfied a false discovery rate (FDR) of 1% with peptides of a minimal length of 8 amino acids [38].

ChIP

C2C12 cells on 14 cm culture dishes (10 millions cells per dish) were treated 10 min at 25°C with cross-linking buffer (buffer A, ChIP Diagenode kit) at a final concentration of 1% formaldehyde. The cross-linking reaction was quenched by addition of glycine at 0.125 M (5 mM at 25°C) and the cross-linked cells were washed with the ice-cold PBS and treated with 500 μ L of lysis buffer (buffer B, Diagenode kit). Lysates were centrifuged for 5 min at 4°C, pellets were resuspended in 50 μ L of buffer C, containing protease inhibitors and incubated for 10 min at 4°C with gentle mixing. DNA was adjusted at a concentration of 10 ng/ μ L, as recommended by the supplier. The chromatin samples were sonicated for 15 cycles of 30 sec "ON"/30 sec "OFF" using the Bioruptor from Diagenode, then subjected to immunoprecipitation using antibodies anti-hnRNPM (1/D8) (Santa Cruz Biotechnologies), or anti- $p54^{nrb}$ /NONO (BD Bio-sciences), or without antibody for the "mock" control. The immunoprecipitates or the input without immunoprecipitation were qPCR-amplified using according to the manufacturer's instructions. The TBP (TATA binding protein) gene was used as a reference gene.

RNA immunoprecipitation (RIP)

RNA-binding protein immunoprecipitation (RIP) is the RNA analog of the more well-known ChIP application and used to identify specific RNA molecules (of many types) associated with specific nuclear or cytoplasmic binding proteins. C2C12 cells on 14 cm culture dishes were treated for 10 min at 25°C with cross-linking buffer containing formaldehyde at 1% final concentration (buffer A, Magna RIP kit from Millipore). The cross-linking reaction was quenched for 5 min at 25°C with addition of glycine to 0.125 M. The cross-linked cells were rinsed twice in cold phosphate-buffered saline (PBS 1X). Cells were scraped with a rubber policeman in 10 mL PBS 1X and pelleted by centrifugation at 1500g for 5 min at 4°C. Pellets were resuspended in 500 μ L of RIP lysis buffer (1% NP40, 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, protease inhibitor cocktail 1x, RNases inhibitors, Magna RIP kit, Millipore).

50 μ L of magnetic beads protein A/G was washed four times in 500 μ L of RIP wash buffer (0.05M Tris, 0.15M NaCl, pH 7.5) then incubated for 30 min at room temperature with 10 μ g of antibody anti-hnRNPM (1/D8 Santa Cruz Biotechnologies), anti- $p54^{nrb}$ /NONO (BD Bio-sciences) or anti-IgG. The beads-antibody complex was washed twelve times in 500 μ L of RIP wash buffer before adding 900 μ L of immunoprecipitation buffer (RIP wash buffer: 0.5 M EDTA, 5 μ L RNase inhibitor). The cell lysate was centrifuged at 14000 rpm for 10 min at 4°C, 100 μ L of the supernatant was added to each sample of beads-antibody complex and incubated at 4°C overnight. Immunoprecipitates were washed six times before protein and RNA recovery. Proteins were recovered with 50 μ L of SDS-PAGE loading buffer and analyzed by Western Blot. RNA was recovered by incubation of the immunoprecipitate for 30 min at 55°C in 150 μ L of proteinase K buffer containing 117 μ L of RIP wash buffer, 15 μ L of SDS 10% and 18 μ L of proteinase K at 10 mg/mL. The immunoprecipitates were analyzed by RT-PCR using the High-

Capacity cDNA Reverse Transcription kit from Applied Biosystems and qPCR-amplified according to the manufacturer's instructions.

Immunoprecipitation

C2C12 cells were harvested in 1 mL PBS (1X), pelleted and resuspended in 100 µL of lysis buffer (RIPA). 100 µL Protein G-plus or Protein A was precoated with mouse anti-hnRNPM (1D8 Santa Cruz Biotechnologies) or anti-p54 antibody (BD Biosciences), and was incubated with 70 µL of the cell lysate. After 5 times washing with IP buffer plus 0.5% BSA, proteins were eluted in 100 µL elution buffer and 50 µL was loaded on SDS-PAGE gel for Western analysis using rabbit antibodies against hnRNPM (Sigma AV40620), p54 (Sigma N8789). Mock experiments were performed similarly but without primary antibody.

Western blotting

C2C12 were harvested in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 20 µL protease inhibitor mixture (Roche) and clarified by centrifugation at 13000 rpm for 10 min at 4°C. Proteins supernatant were quantified using the Bradford method (Biorad).

Primary antibodies were mouse monoclonal antibodies against hnRNPM (Santa Cruz Biotechnologies, 1/400), p54nrb (BD Bio-sciences, 1/400), myogenin (Santa Cruz Biotechnologies 1/400), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Santa Cruz biotechnologies 1/10000) and the rabbit polyclonal FGF1 (F5521, sigma, 1/400). Secondary antibodies were peroxidase-conjugated-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG and AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 1/10000).

Protein detection was carried out using Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate and ECL western blotting substrate (ThermoScientific).

RNA extraction and real time RT-qPCR

Total RNA was isolated from C2C12 cells using Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel). After DNase I treatment (DNase I Amplification Grade, Invitrogen), reverse transcription was performed with the High capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). As an internal control, ribosomal 18S (m18S) RNA was used.

Quantitative PCR was performed on a Stepone sequence detection system (Applied Biosystems) using Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for detection of LucF, LucR, FGF1 and 18S transcripts.

Primer sequences are available upon request.

Reporter activity assay

Protein from C2C12 cells were extracted with reporter Passive Lysis buffer (Promega) and protein concentration was quantified by Bradford Standard Assay. Quantification of bioluminescence was performed with a luminometer (Centro LB960, Berthold) using the Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega France).

Ethics statements

Experiments have been conducted with the genetically modified organisms agreement n°496 from the French Technologies High Committee.

Authors comply with best practices in publication ethics, specifically regarding authorship, dual publication, plagiarism, figure manipulation, and competing interests.

Results

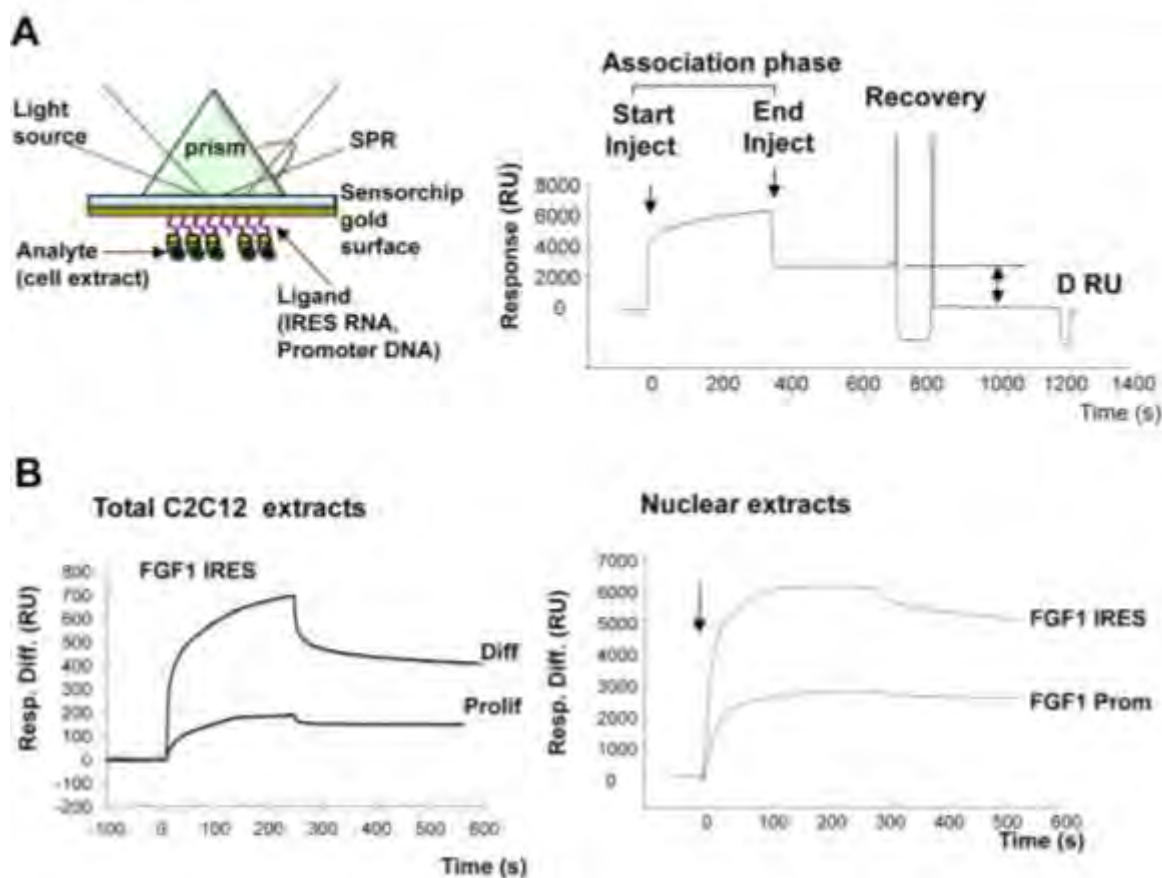
BIA-MS identification of $p54^{nrb}$ and hnRNPM bound to the FGF1 promoter and IRES

BIA-MS technology was used to identify proteins bound to the FGF1 promoter A and IRES A. Biotinylated promoter DNA and IRES RNA were (separately) immobilized on biacore streptavidin sensorships (Fig 1A). This method is not denaturing and allows identification of proteins present in the complex bound to DNA or RNA. Binding to nucleic acids may be direct or indirect. Total or nuclear cell extracts, from proliferating or differentiating C2C12 cells (day 2), were injected into the BIACORE 3000 apparatus to obtain the association phase (Fig 1B). Interestingly, a significant association was obtained with extracts of differentiating cells, but not with proliferating cell extracts. Using nuclear extracts an important binding activity was obtained with both FGF1 IRES RNA and promoter DNA. Bound proteins were recovered and identified by nanoLC-MS/MS after tryptic digestion (Fig 1C and S1 File). Proteins from total extracts bound to the IRES included: 1) ribosomal proteins and elongation factor eEF1A1, expected to be involved in translation and 2) nuclear proteins including several histones, nucleophosmin, and the splicing protein hnRNPM (Fig 1C, Table A in S1 File) [37–39]. Using nuclear extracts, we identified IRES interactions with the splicing proteins hnRNPA3, U2AF2, SFR2 and U5 snRNP component 51 as well as $p54^{nrb}$, a protein involved in both splicing and transcription (Fig 1C, Table B in S1 File) [27, 38]. Interestingly, none of these proteins bound the EMCV IRES, used as a control (Table C in S1 File). Several DNA binding proteins were identified as interacting (directly or indirectly) with the FGF1 promoter: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), transcriptional activator Purp, ATP-dependent DNA helicases KU70 and KU86 and $p54^{nrb}$, which was also bound to the IRES (Fig 1C, Table D in S1 File). The dual presence of $p54^{nrb}$ promoted it as the most interesting candidate. Furthermore, its interaction with hnRNPM and co-localization within defined nuclear structures incited us to focus on the role of these two proteins in the control of FGF1 expression during myoblast differentiation [40].

$p54^{nrb}$ and hnRNPM bind to FGF1 promoter and IRES in differentiating, but not in proliferating myoblasts

Interaction of hnRNPM and $p54^{nrb}$ with the promoter was analyzed by chromatin immunoprecipitation (ChIP), using DNA extracts either from proliferating or differentiating myoblasts (Fig 2A). We checked by immunoprecipitation that the two proteins are expressed in proliferating as well as in differentiating cells (Fig 2B). However no interaction was detected with either of the two proteins in proliferating cells, whereas significant interaction was observed with both proteins in differentiating myoblasts (Fig 2A). RNA immunoprecipitation (RIP) was also performed using anti-hnRNPM or anti- $p54$ antibodies revealing that the two proteins interact with the FGF1 IRES RNA in differentiating, but not in proliferating, myoblasts (Fig 2C). These data demonstrated that hnRNPM and $p54^{nrb}$ interact (directly or indirectly) with FGF1 promoter A and IRES A only in differentiating myoblasts. In contrast the two proteins very poorly interact with the FGF2 IRES, and such interaction did not increase during differentiation (Fig 2D).

Thus, hnRNPM and $p54^{nrb}$ binding to FGF1 promoter and IRES correlates with the previously shown induction during differentiation [4]. Binding and activity are very weak during proliferation and induced by day 2 of differentiation. This suggests that these proteins may be involved in the specific activation of FGF1 mRNA accumulation and IRES-mediated translation.



C

Candidate proteins identified by mass spectrometry in differentiating C2C12

	Total cell extracts	Nuclear extracts	
Probe:	FGF1 IRES RNA	FGF1 IRES RNA	FGF1 Promoter DNA
	Elongation factor 1-a1 Histone H1.3 Histone H1.4 Histone H1.5 Histone H1L Histone H2B type1-B Histone H4 HnRNP M Nucleophosmine NPM1	HnRNP A3 P54^{nrb}/NonO Non-POU RNPS1 SmD1 Splicing factor SFR2 Splicing factor U2AF2 SRRM1 U5 snRNP component 1	P54^{nrb}/NonO Non-POU Poly (ADP-ribose) polymerase Transcriptional activator Purb ATP-dep DNA helicase KU70 ATP-dep DNA helicase KU86

Fig 1. Identification of RNA and DNA binding proteins by BIA-MS. (A) BIACORE 3000 analysis using surface plasmon resonance. Left: the ligand corresponding to biotinylated RNA or DNA is immobilized by streptavidin coupled to the sensorchip gold surface. On the other side of the sensorchip, a light source is directed to the sensorchip through a prism and is reflected in all angles except one at which it is absorbed into the gold surface in the form of an evanescent wave. The binding of the analyte corresponding to RNA or DNA binding proteins to the ligand results in a change in the index of refraction proportional to the number of bound molecules. This generates a shift in the absorption angle that is recorded by the detector and appears on a sensogram. Right: Sensogram generated during a binding cycle followed by protein recovery. The response appears in resonance units (RU). The association phase lasts from the start to the end of analyte injection (400 s). Protein recovery is achieved at 800 s and the Δ RU indicates the efficiency of dissociation of the bound proteins. (B) C2C12 myoblast protein binding and recovery. Total extracts of proliferating or differentiating C2C12 myoblasts (left) or nuclear extracts of differentiating C2C12 (right) were injected as analytes in several BIACORE 3000 channels after immobilization of ligands corresponding to FGF1 IRES A RNA (nt 1 to 442) or promoter A DNA (distal part nt 1 to 391). Bound proteins were recovered as described in Mat. & Meth. (C) Mass spectrometry analyses of proteins recovered from the BIACORE 3000 experiments. For each BIA-MS experiment, 6 recovery cycles were pooled to obtain a sufficient RU quantity (about 2000 RU). The mass spectrometry analysis was performed as described in Mat. & Meth. The most significant proteins (RNA and DNA binding proteins) are listed here, whereas the complete list is provided in S1 File. hnRNPM and p54^{nrb} have been selected as the most interesting candidates.

doi:10.1371/journal.pone.0136466.g001

p54^{nrb} and hnRNPM knockdown silences the FGF1 promoter-dependent accumulation of mRNA during myoblast differentiation

The role of p54^{nrb} and hnRNPM on FGF1 expression was studied by a knockdown approach using siRNA smartpools targeting either p54^{nrb} (sip54) or hnRNPM (siM) (S2 File). Myoblasts were co-transfected with bicistronic vectors containing the FGF1 IRES and siRNAs. The bicistronic cassette, coding for *renilla* luciferase (LucR) and firefly luciferase (LucF) separated by the FGF1 IRES, was under the control of either the CMV promoter or the FGF1 promoter A (Fig 3). Endogenous FGF1 mRNA was quantified by RT qPCR, and expression of the bicistronic mRNA under the control of either the CMV or FGF1 promoter was compared.

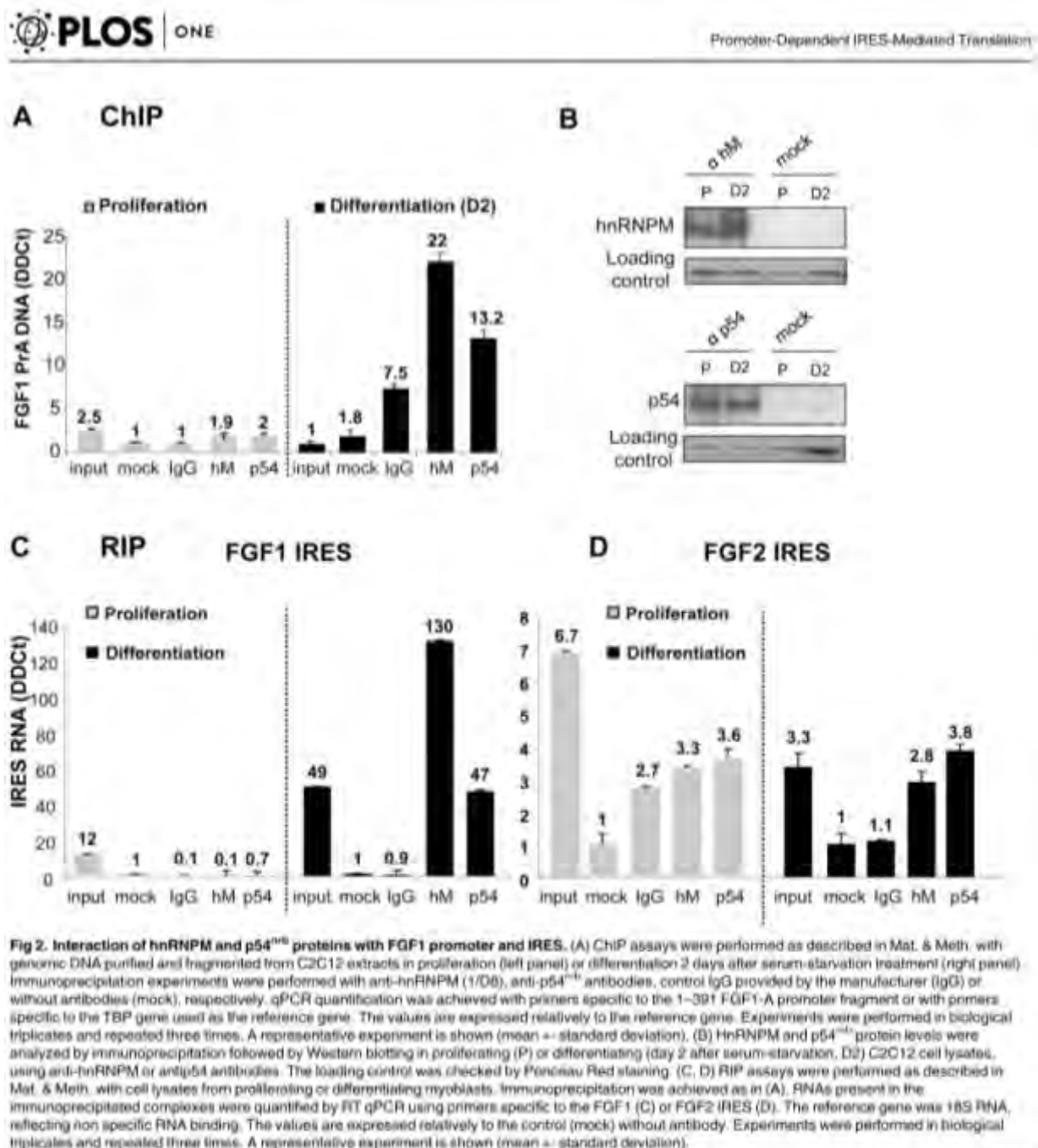
RT qPCR quantification of endogenous FGF1 mRNA clearly showed, as we have previously reported, a strong induction of FGF1 mRNA accumulation at day 2 of differentiation [4]. This induction was abolished upon transfection with siRNA against either hnRNPM or p54^{nrb} (Fig 4A and S2 File).

Bicistronic mRNA levels produced from the CMV or FGF1 promoter were quantified with LucF and LucR couples of primers. No variation of mRNA amount was observed with the CMV promoter in response to siRNA knockdown of hnRNPM or p54^{nrb} (Fig 3B). In contrast, the level of bicistronic mRNA transcribed from the FGF1 promoter was strongly downregulated by hnRNPM or p54^{nrb} knockdown in differentiating myoblasts (Fig 3C). In addition, the two cis-trans LucR and LucF were present in equal amounts in all experiments, ruling out any effect of hnRNPM or p54^{nrb} on a putative cryptic splicing site or promoter in the IRES (Fig 3B and 3C).

These data showed, together with the ChIP data (Fig 2A), that hnRNPM and p54^{nrb}/NONO binding to the FGF1 promoter A is responsible for FGF1 mRNA accumulation during myoblast differentiation, suggesting an effect of these proteins on the FGF1 mRNA transcription or stability.

p54^{nrb} and hnRNPM knockdown silences the FGF1 IRES during myoblast differentiation

The knockdown approach was also used to evaluate the effect of hnRNPM and p54^{nrb} on translation mediated by the FGF1 IRES A. In the bicistronic construct, LucR activity reflects the mRNA level and cap-dependent translation while LucF reflects the IRES activity. Luciferase activities were measured in myoblasts co-transfected with bicistronic vectors and siRNAs targeting hnRNPM and/or p54^{nrb} (see above, and S2 File). Under the CMV promoter, FGF1 IRES activity decreased by 5.6 or 7 fold following knockdown of hnRNPM or p54^{nrb}, respectively (Fig 4A, left panel). A double knockdown resulted in a 13.5 fold inhibition (Fig 4A, right panel). These effects were observed in differentiating but not proliferating myoblasts. When the bicistronic cassette was under the control of the FGF1 promoter A, the IRES activity was 39



doi:10.1371/journal.pone.0136466.g002

fold higher than with the CMV promoter (as published previously) and more strongly affected by hnRNPM or $p54^{nrb}$ knockdown (8 and 11 fold, respectively, Fig 4B, left panel) [4]. In addition, the double knockdown drastically inhibited the IRES activity 54 fold (Fig 4B, right panel). Additional siRNAs targeting $p54^{nrb}$ or hnRNPM, but not contained in the smartpools, were

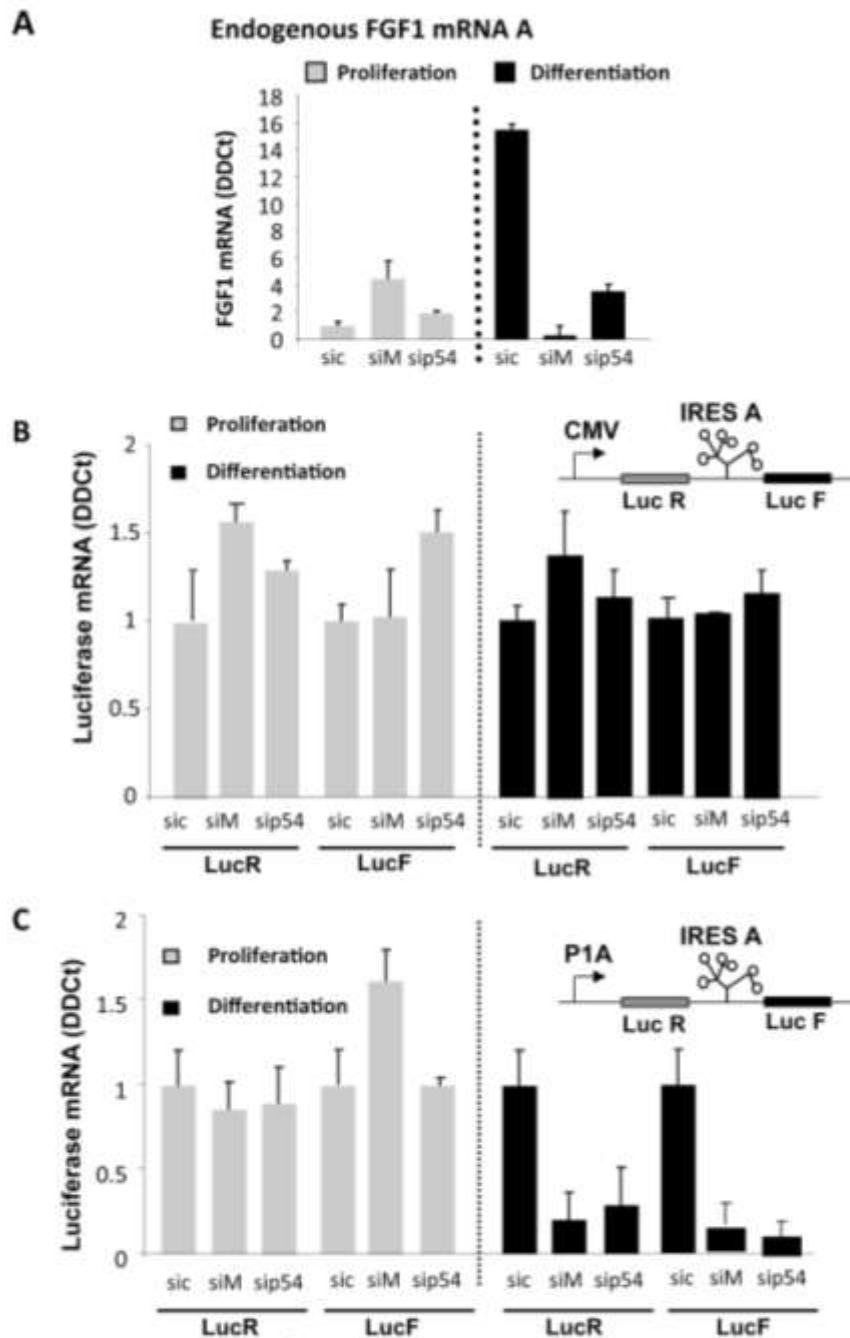


Fig 3. Effect of hnRNPM and $p54^{nrb}$ knockdown on expression of endogenous FGF1 mRNA and bicistronic mRNAs during myoblast differentiation. (A) RT qPCR quantification of endogenous FGF1 mRNA A was performed as described in Mat. & Meth. during C2C12 myoblast proliferation or day 2 differentiation after transfection with siRNA ONE TARGET PLUS smartpool against hnRNPM (siM), $p54^{nrb}$ (sip54) or siRNA control (sic). mRNA

quantification was standardized with RNA 18S. Experiments were performed in biological triplicates and repeated three times. A representative experiment is shown (mean \pm standard deviation). The knockdown efficiency, analyzed by Western blot, is shown in S2 Fig and was also checked by RT-qPCR (not shown). (B, C) C2C12 cells co-transfected with bicistronic plasmids and 48h later with siRNA siM, siP54 or siC as above. Renilla luciferase (LucR, left) and firefly luciferase (LucF, right) mRNA levels were quantified by RT-qPCR during C2C12 myoblast proliferation (grey histograms) and differentiation (black histograms), standardized to 18S RNA. The bicistronic cassette contains either the CMV promoter (B) or the FGF1 promoter A (C). For each experiment, values are shown relatively to the siRNA control. Experiments were performed in biological triplicates and repeated at least three times. A representative experiment is shown (mean \pm standard deviation).

doi:10.1371/journal.pone.0136486.g003

assessed, confirming that the effect of p54 or hnRNPM knockdown on FGF1 IRES activity is specific to these targets (S3 Fig).

To check the specificity of FGF1 IRES regulation by hnRNPM and p54^{nrb}, knockdown was performed as above using bicistronic constructs with the EMCV or FGF2 IRES. Results showed that the activities of the EMCV and FGF2 IRESs remained completely unaffected by either knockdown (Fig 4C and 4D).

These data suggested that hnRNPM and p54^{nrb} participate in the IRESome complex responsible for FGF1 IRES A activation during myoblast differentiation, but are unable to activate EMCV or FGF2 IRESs. In addition, the presence of the FGF1 promoter A stimulated the IRES activating function of the two proteins, suggesting that the recruitment of hnRNPM and p54^{nrb} on the promoter by a direct or indirect interaction might enhance their recruitment in the IRESome.

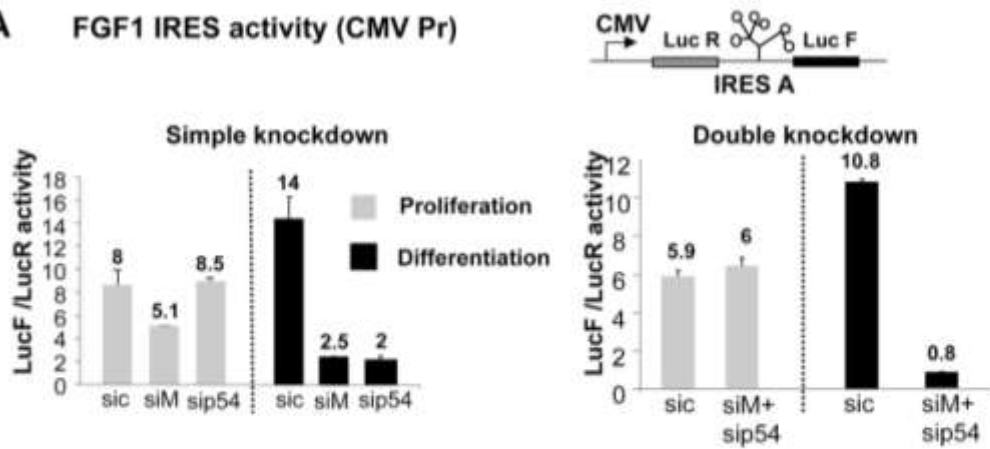
P54^{nrb} is sufficient to stimulate the FGF1 promoter whereas it cooperates with hnRNPM to activate the FGF1 IRES

To evaluate the double activity of p54^{nrb} and hnRNPM on FGF1 promoter and IRES, C2C12 myoblasts were co-transfected by the bicistronic FGF1 IRES-containing dual luciferase plasmid and by plasmids coding either p54^{nrb} or hnRNPM, or both proteins (Fig 5A and 5B). Measurement of the LucR activity showed significant mRNA accumulation in response to p54^{nrb} overexpression (Fig 5C). The IRES activity reflected by the ratio LucF/LucR was enhanced by p54^{nrb} alone, but more strongly with the combination of p54^{nrb} and hnRNPM (Fig 5D and 5E). Surprisingly, overexpression of hnRNPM alone inhibited both mRNA accumulation and IRES activities, suggesting that the ratio of the two proteins may be important for hnRNPM function (Fig 5C–5E). The effects of protein overexpression were stronger in proliferating myoblasts, which could be expected, because promoter and IRES are in a basal inactive state in proliferating cells, while they are activated by the endogenous p54^{nrb} and hnRNPM in differentiating cells. These results suggested that p54^{nrb} is sufficient to enhance mRNA accumulation, whereas it cooperates with hnRNPM to stimulate the IRES. Such a cooperative effect confirmed the data of the knockdown experiments (Figs 3 and 4).

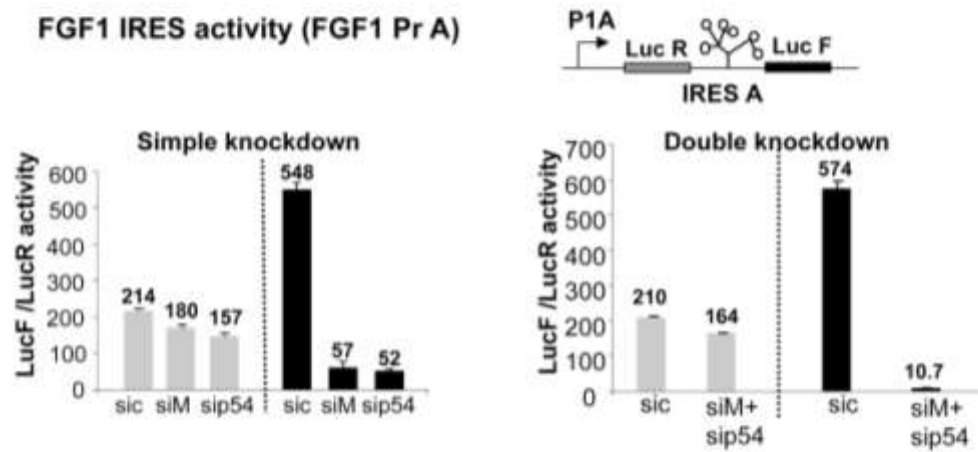
Regulation of IRES activity by hnRNPM and p54^{nrb} is promoter-dependent

To analyse the impact of the promoter on activation of IRES-dependent translation by hnRNPM and p54^{nrb}, C2C12 cells were transfected with either bicistronic plasmid DNAs or in vitro transcribed capped and polyadenylated bicistronic mRNAs (Fig 6). DNA transfection resulted (as already shown in Fig 4) in a high FGF1 IRES activity, strongly induced by C2C12 differentiation, and downregulated by the knockdown of hnRNPM or p54^{nrb} (Fig 6A and 6B Fig). In contrast, basal FGF1 IRES activity was 500 times lower following RNA transfection, and no induction by either hnRNPM or p54 was observed (Fig 6B and S4 Fig). These features were not observed with the EMCV IRES, whose activity was low after DNA or RNA transfection and was not affected by hnRNPM or p54 knockdown (Fig 6C and 6D). As a negative

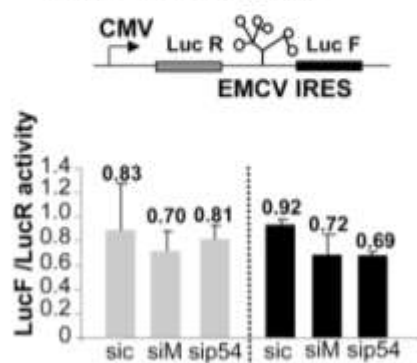
A FGF1 IRES activity (CMV Pr)



B FGF1 IRES activity (FGF1 Pr A)



C EMCV IRES activity



D FGF2 IRES activity

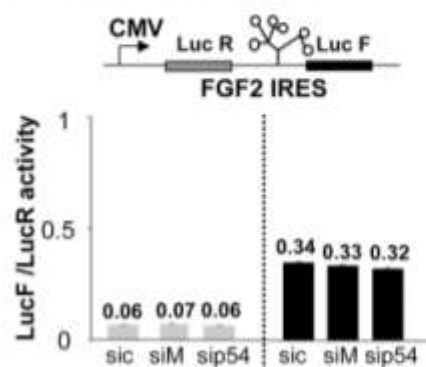


Fig 4. Effect of hnRNPM and/or p54^{nrh} knockdown on the regulation of FGF1 IRES A activity during myoblast differentiation. C2C12 cells were first transfected with bicistronic plasmids and 48h later with siRNAs targeting hnRNPM (siM), p54^{nrh} (siP54) or control (siC), (see Fig 3). Luciferase activities were measured as described in Mat. & Meth two days after siRNA transfection, from C2C12 myoblasts maintained in proliferation (grey histogram) or serum-starved to induce differentiation (day 2, black histogram). The bicistronic cassette contains LucR and LucF reporter genes, separated by different IRESs (FGF1, FGF2 or EMCV). LucR and LucF activities reflect the cap-dependent and IRES dependent translation, respectively [4]. The knockdown efficiency was checked by Western blot (S2 Fig). (A, B) FGF1 IRES activities were measured in C2C12 myoblasts in proliferation (grey histogram) and differentiation two days after serum-starvation treatment (black histogram). The bicistronic constructs are schematized. The bicistronic cassette is under the control of either the CMV promoter (A) or the FGF1 promoter A (B). Single and double knockdowns are shown in left and right panels, respectively. IRES activities are represented as LucF/LucR ratios. (C, D). Absence of effect of hnRNPM and/or p54^{nrh} knockdown on the regulation of EMCV and FGF2 IRESs during myoblast differentiation. Activities of EMCV (C) and FGF2 (D) IRESs were measured as above. For all panels, experiments were performed in biological triplicates and repeated at least three times. A representative experiment is shown (mean \pm standard deviation).

doi:10.1371/journal.pone.0136466.g004

control, we used a construct containing a hairpin between the two exons instead of an IRES. The LucF/LucR ratios in the absence of an IRES were very low for both DNA and RNA transfections and were not affected by hnRNPM or p54 knockdown (Fig 6E and 6F). These results suggested that a nuclear step may be a prerequisite to IRES induction by the hnRNPM and p54^{nrh}.

To go further with this hypothesis, we transfected C2C12 with a construct containing a deleted form of promoter F1A, P1AΔ1-391 (Fig 7). Measurements of LucR activity showed that this promoter is about ten times less efficient than the wild type promoter, whereas it was still sensitive to hnRNPM and p54 knockdown (Fig 7A). In contrast, in the presence of the deleted form of the promoter, IRES activity was no longer induced and was very mildly altered by the knockdown of hnRNPM or p54^{nrh} (Fig 7B).

These two sets of data showed that FGF1 IRES induction by hnRNPM and p54^{nrh} depends on a sequence present in the promoter and involves multifunctional roles of these proteins.

p54^{nrh} and hnRNPM are required for FGF1 induction and myotube formation

To determine whether p54^{nrh} and hnRNPM are responsible for endogenous FGF1 induction during differentiation and if these proteins exhibit a physiological role in the development of muscle fiber, single and double knockdowns of hnRNPM and/or p54^{nrh} were performed (Fig 8A). Expression of FGF1, analyzed by Western Blot, was strongly inhibited by the simple or double knockdown (Fig 8A and data not shown). Furthermore, formation of myotubes was drastically affected by knockdown of p54^{nrh} or hnRNPM, and even more strongly inhibited by the double knockdown (Fig 8B). Decrease of endogenous FGF1 expression upon treatment with siRNA against p54^{nrh} and/or hnRNPM confirmed that these two proteins are involved in the control of FGF1 expression and consequently in its induction during differentiation. In addition, these data also revealed that p54^{nrh} and hnRNPM are required for differentiation of myoblasts into myotubes, revealing the important role of these proteins in myogenesis.

Discussion

The present data reveal that FGF1 IRES activity is promoter-dependent and that this process is governed by two multifunctional trans-acting factors, p54^{nrh} and hnRNPM. P54^{nrh} and hnRNPM also appear as crucial actors of myoblast differentiation, demonstrating the physiological relevance of this new mechanism.

Nuclear formation of the IRESome

The present data suggest that IRESome formation occurs in the nuclear compartment. The regulating features of p54^{nrh} and hnRNPM on both promoter and IRES activities are not

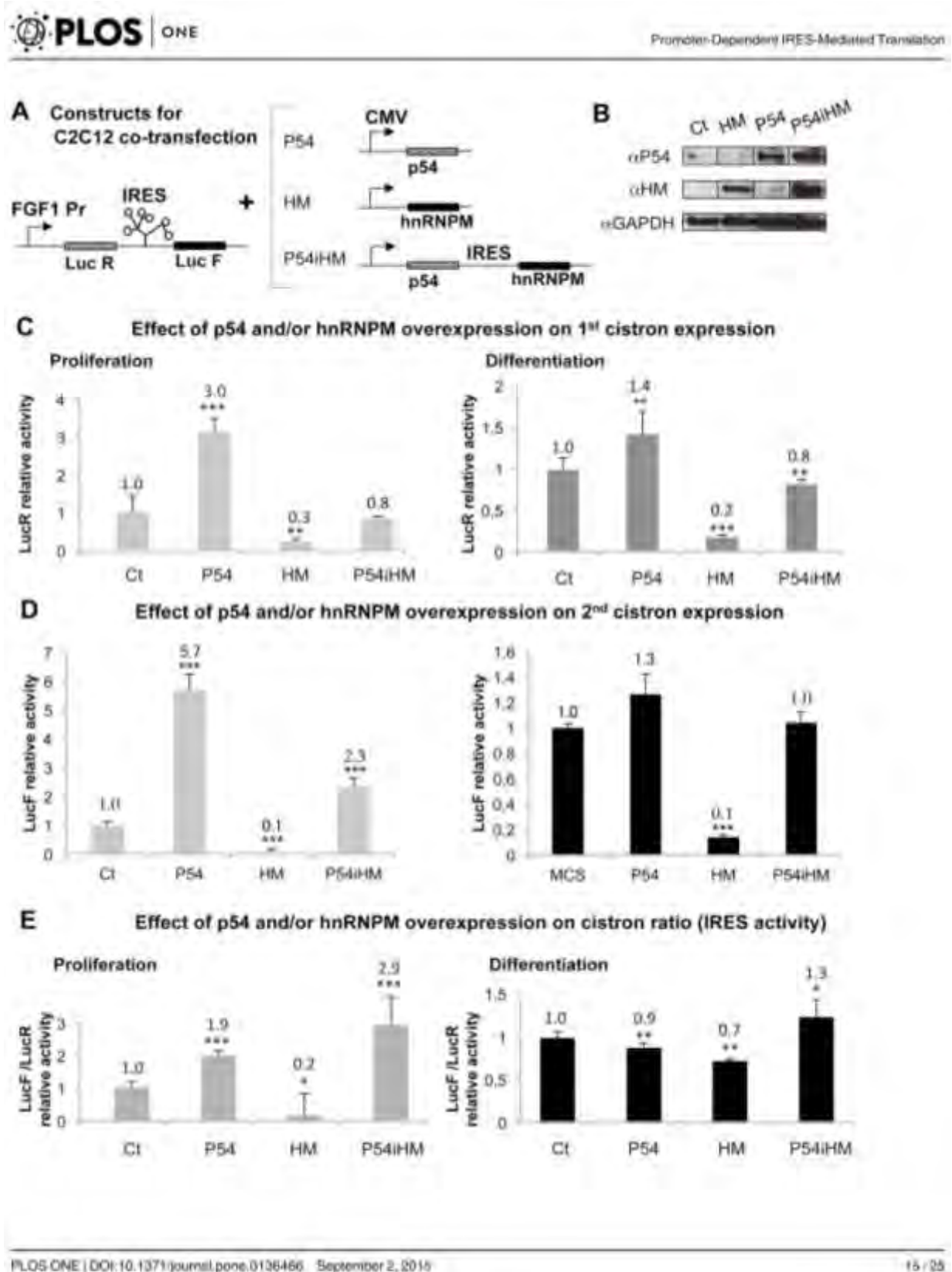


Fig 5. Cooperative effect of p54^{nrb} and hnRNPM on FGF1 IRES activation. (A) Schema of the constructs used for C2C12 cell co-transfection. The target plasmid is the bicistronic dual luciferase vector with the FGF1 promoter and IRES. The effector plasmids express p54^{nrb} (p54) or hnRNPM (HM), or co-express p54^{nrb} and hnRNPM. The latter plasmid is a bicistronic construct containing the FGF1 IRES. (B) Western blots of transfected proliferating C2C12 cell extracts using antibodies against p54 (p54), hnRNPM (pHM) or GAPDH as a control (pGAPDH). (C-E) Luciferase activities measurement of co-transfected proliferating or differentiating C2C12 cell extracts. LucR activity reflects the FGF1 mRNA promoter activity (as cap-dependent translation does not significantly vary, as shown by RNA transfection, see Table B in S4 File). (C). LucF reflects IRES-dependent translation but is also dependent on mRNA amount (D). LucF/LucR ratio reflects the IRES activity normalized to mRNA amount, expressed relatively to the control (co-transfection with empty vector) (E). Experiments were performed in biological triplicates and repeated three times. The statistical test used is the Student test (mean ± standard deviation, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

doi:10.1371/journal.pone.0136466.g005

independent events, as these two translational regulators do not work when the promoter is absent (RNA transfection) or inactivated (promoter mutation).

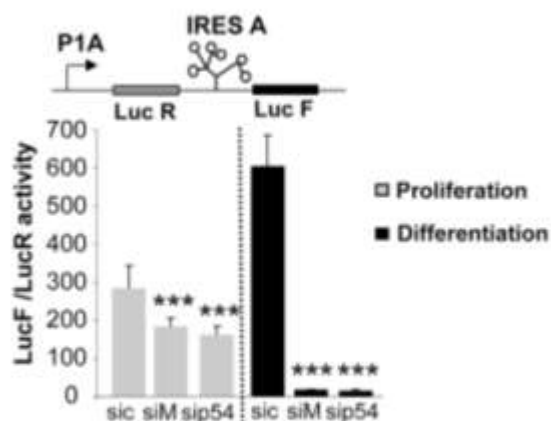
The importance of ITAF subcellular localization in the regulation of their activity appeared a few years ago, with the first observation that a nuclear event is required in the control of c-myc IRES activity [18]. Later, it has been shown that shuttling of ITAFs, such as hnRNP A1, RBM4, PTB and PCBP1, between the nucleus and the cytoplasm influences their activity [24, 27, 30, 41]. Two different mechanisms have been proposed [42]: 1) the nuclear localized ITAFs may associate with their target in this compartment, resulting in the sequestration of the mRNA in the nucleus until an appropriate signal occurs, allowing cytoplasmic export and translation, 2) the ITAFs may be primarily located in the nucleus to keep them separate from their target IRESs and await a signal that warrants their accumulation in the cytoplasm. These two models could apply to cellular and viral IRESs, respectively, as explained by Semler & Waterman who argue that nuclear versus cytoplasmic synthesis of IRES-containing mRNAs is a major determinant in assembling different RNA-protein complexes [43]. The synthesis of uncapped picornaviral mRNAs occurs in the cytoplasm, in contrast to cellular mRNAs, which are transcribed in the nucleus and then exported to the cytoplasm. Our study not only reinforces the hypothesis that the IRESome is constituted in the nucleus, but further elaborates this model by showing that its formation is influenced by the promoter activity.

hnRNPM and p54^{nrb} cooperate in activation of IRES-dependent translation

The IRES-regulating function of hnRNPM discovered in our study represents a novel finding, as well as its cooperative activity with p54^{nrb}. Interestingly, nuclear interaction of hnRNPM and p54^{nrb} has been previously reported [40]. Like other hnRNPs, hnRNPM has been first identified as a splicing regulatory protein, associated with early spliceosomes where it modulates the alternative splicing pattern of specific mRNAs including the FGF receptor [39, 40]. Interestingly, hnRNPM has also been reported to influence the localization of *nanos* mRNA by binding to its 3' UTR [44]. The additional function of hnRNPM shown in our study confirms that hnRNPs are multifunctional, depending on their interacting partners.

p54^{nrb}/NONO is also a multifunctional protein. It has been previously shown to associate with 5' splicing sites in large transcription/splicing complexes, providing a direct role for this protein in linking transcription to splicing [5, 45]. P54^{nrb} also behaves as a specific transcriptional activator, binding to the intracisternal A particle proximal enhancer element, and as an RNA binding protein, preferentially binding to the sequence UAGGGA/U identified by SELEX [37]. In addition, p54^{nrb} has been identified as an ITAF of the myc family IRESs (c-, L- and N-myc), and has also been shown to stimulate the APAF-1 IRES [46]. Here we demonstrate that p54^{nrb} is able to cooperate with hnRNPM, suggesting that the two proteins may activate the FGF1 IRES as a complex. Unexpectedly, hnRNPM overexpression is inhibitory, whereas knockdown experiments clearly showed it is required for both IRES and promoter activation. We hypothesize that excess of hnRNPM might inhibit p54^{nrb} functions on FGF1 gene

A DNA transfection



B RNA transfection

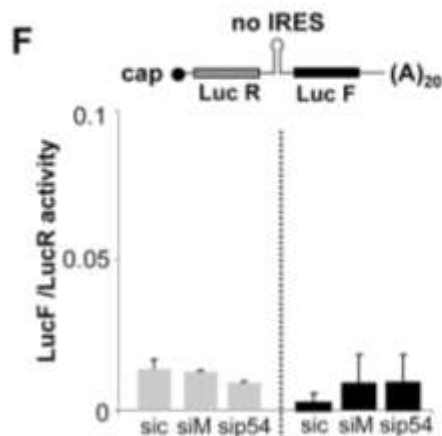
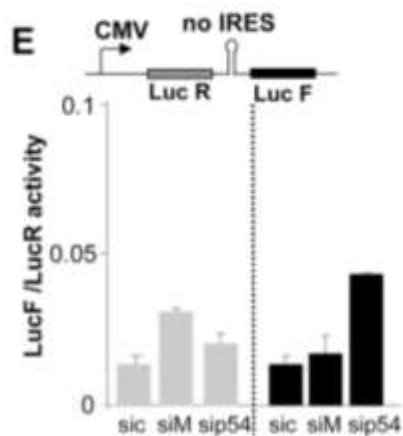
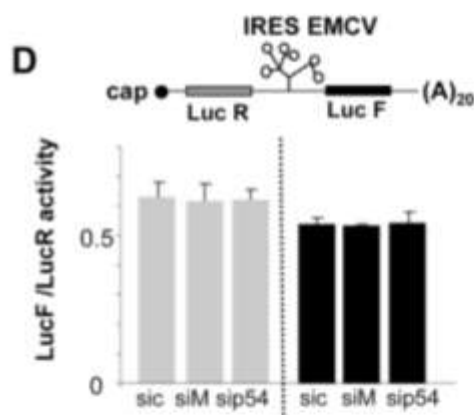
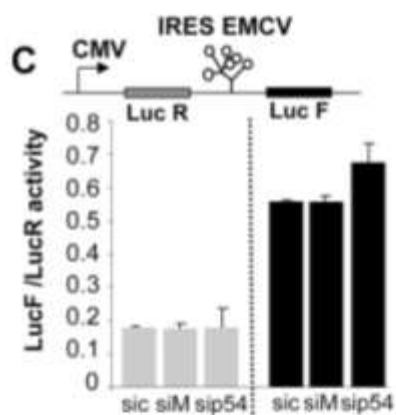
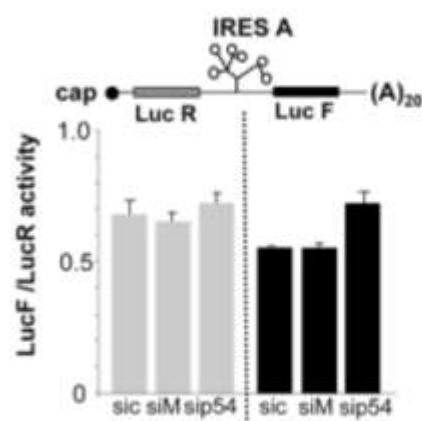


Fig 5. Comparison of IRES activities following DNA or RNA transfection. (A, C, E) C2C12 cells were transfected with bicistronic plasmids containing either the FGF1 IRES, or EMCV IRES or a hairpin (control without IRES) and with siRNA siM, siP54 or siC, and IRES activities measured as in Fig 4B–4D and 4F. C2C12 cells were transfected with siRNA siM, siP54 or siC and 24h later with bicistronic mRNAs containing either the FGF1 IRES, or the EMCV IRES, or a hairpin as above. mRNAs were transcribed in vitro, capped and polyadenylated, as described in Mat. & Meth. The LucF/LucR activity ratio was measured 12h post-transfection. Experiments were performed in biological triplicates and repeated three times. The Student test was used. A representative experiment is shown (mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). For A and B, the Luc R and Luc F values are shown in S4 File.

doi:10.1371/journal.pone.0136466.g006

expression, presumably by preventing $p54^{nrb}$ binding to FGF1 DNA and RNA due to an inadequate stoichiometry of the two proteins.

Although the proteins are expressed in proliferating cells, they are not found in the complex with the IRES or the promoter A. This suggests that the proteins might carry different post-translational modifications. Alternatively these proteins could join the complex through the interaction with another protein, which is absent in the proliferating cells and remains to be discovered. This could also explain that overexpressed hnRNPM is not functional.

Very few proteins were bound to the EMCV IRES, which may be explained by the low efficiency of the EMCV IRES in myoblasts. However, we were also surprised that no transcription factor was bound to promoter DNA. This indicates that BIA-MS does not provide an exhaustive view of all proteins bound to RNA or DNA and that one can miss important proteins. This also explains that we have missed hnRNPM present in the promoter bound complex.

Although the direct interaction of $p54^{nrb}$ and hnRNPM with RNA has not been demonstrated, the present study strongly suggest that the two proteins are ITAFs involved in FGF1 IRES activation. However The BIA-MS data provides a list of additional proteins bound to the FGF1 IRES, including histones and splicing factors. These proteins may participate in the IRESome ribonucleoprotein.

Promoter-dependent activation of the FGF1 IRES may involve transcription or mRNA stabilization

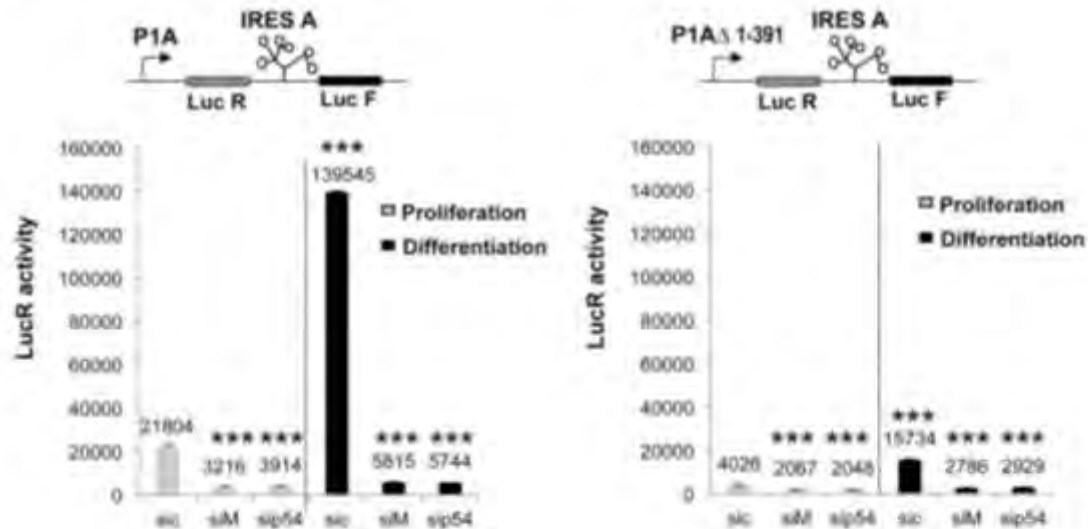
Promoter-dependent translation controlled by hnRNPM and $p54^{nrb}$ asks the question of how a promoter is able to impact on translation, which is in principle cytoplasmic.

One among several possible models, one can propose transcription/translation coupling: hnRNPM and $p54^{nrb}$ might be first recruited to the promoter, where they would contribute to transcription activation. This process would also facilitate hnRNPM and $p54^{nrb}$ binding onto mRNA IRES and subsequently activate IRES-dependent translation. A recent study supports the hypothesis of a co-transcriptional ITAF binding, by showing that the translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response [47]. These authors have demonstrated that eEF1A1 activates HSP70 transcription, then associates with RNA polymerase II, binds the mRNA 3'UTR, stabilizes it and facilitates its nuclear export to active ribosomes. hnRNPM and $p54^{nrb}$ may well have a similar mode of action, except that they bind to the mRNA 5'UTR and directly activate IRES-dependent translation by their ITAF function.

Other hnRNPs have been previously described for their involvement in transcription: hnRNPK, reported as a transcription factor interacting with the RNA polymerase II machinery in the c-myc promoter, and hnRNP A1, involved in the transcription of the KRAS proto-oncogene [48, 49]. More recently, hnRNPC has been shown to regulate transcription in osteoblasts [50]. Interestingly, hnRNP A1 and -K also exhibit an ITAF function, although no coupling between transcriptional and translational functions has been mentioned [26, 28, 30].

An alternative model to explain promoter-dependent regulation of translation by hnRNPM and $p54^{nrb}$ might be their effect on mRNA stability. Binding of these proteins to the FGF1 promoter would not have an effect on transcription but would facilitate their binding to the

A Deleted promoter 1A activity



B IRES A activity in the presence of deleted promoter 1A

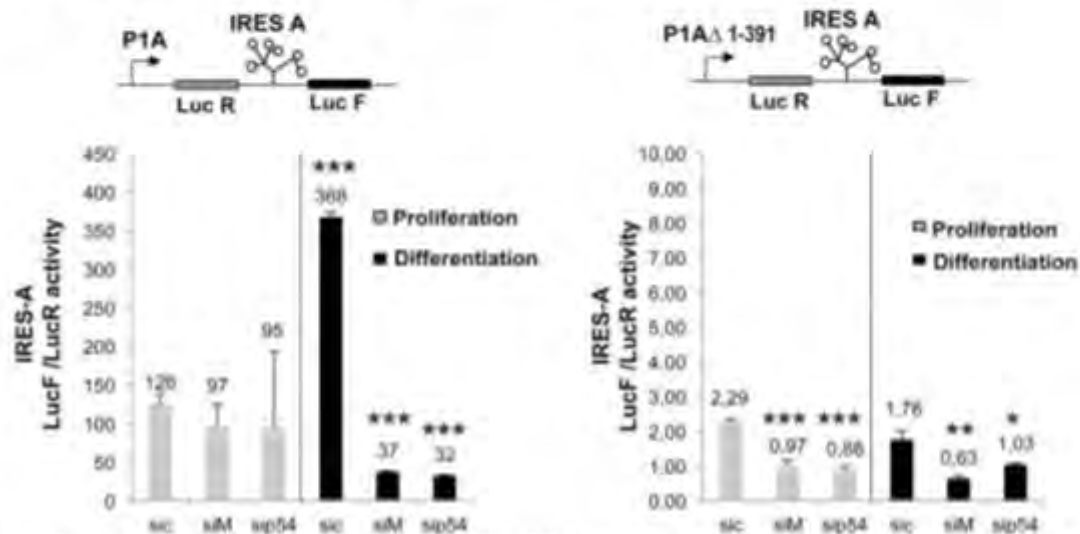


Fig 7. Influence of transcription level on the activity of the FGF1 IRES A. C2C12 cells were transfected with bicistronic plasmids containing either the complete promoter 1A or a deleted promoter lacking nucleotides 1 to 391. Transfected cells were treated 24h later with siRNA siM, sip54 or sic, and luciferase activities were measured as in Fig 5. (A) mRNA expression in the presence of promoter 1A and 1A Δ 1–391 reflected by the LucR activities. (B) Activity of FGF1 IRES A in the presence of promoter 1A and 1A Δ 1–391, reflected by the Luc F/LucR ratio as above. Experiments were performed in biological triplicates and repeated three times. The statistical test used is the Student test. (mean \pm standard deviation, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

doi:10.1371/journal.pone.0136466.g007

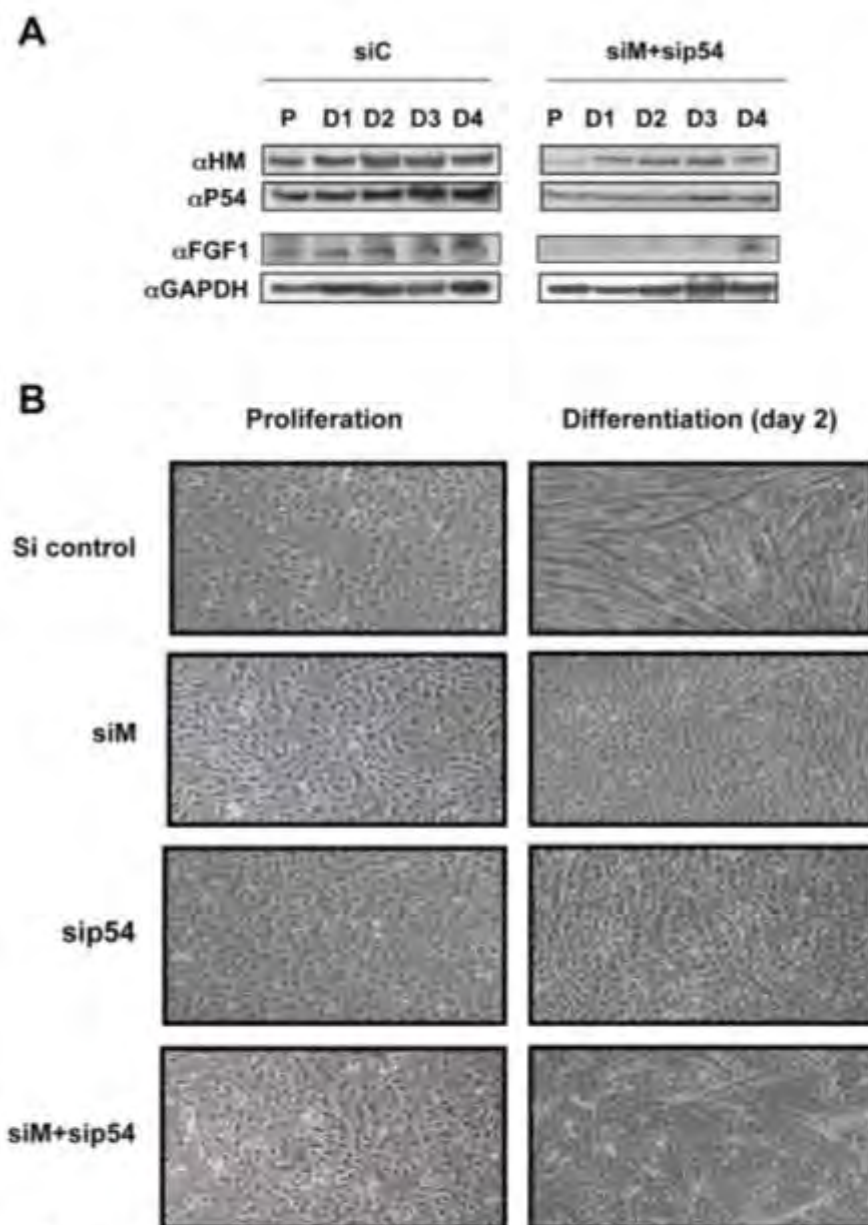


Fig 8. Role of hnRNPM and $p54^{nrb}$ in myoblast differentiation. (A) Effect of hnRNPM and $p54^{nrb}$ knockdown on expression of endogenous FGF1. C2C12 cells were transfected with siRNA, siM+sip54 or sic. Western blot was performed as above using cell extracts of proliferating (P) and differentiating myoblasts (D1 to D4). GAPDH was used as a normalization control. These data correspond to a representative experiment (repeated at least three times). (B) Effect of hnRNPM and/or $p54^{nrb}$ knockdown on myotube formation. C2C12 cells were transfected with siRNA siM, sip54, siM+sip54 or sic and myotube formation was followed by phase contrast microscopy. Data are shown for day 2 cells compared to proliferative cells.

doi:10.1371/journal.pone.0136466.g008

nascent mRNA, resulting in mRNA stabilization, as has been shown for the yeast protein Dbp2p [51]. These authors demonstrate that Dbp2p is recruited to the SW15 and CLB2 promoters, and co-transcriptionally deposited onto the SW15 and CLB2 mRNAs. Once they are exported into the cytoplasm, the two mRNAs are protected from degradation by Dbp2p. According to this model, hnRNPM and $p54^{nrb}$ binding to mRNA might have the double effect of stabilizing the FGF1 mRNA and activating the IRES. Anyway, further investigation is needed to determine whether the promoter-dependent function of hnRNPM and $p54^{nrb}$ involves transcription enhancement or RNA stabilization.

Promoter-dependent translation, a physiologically relevant mechanism during myogenesis

An important feature of our study is the physiological relevance of $p54^{nrb}$ and hnRNPM function in myoblast differentiation. It clearly appears that $p54^{nrb}$ and hnRNPM are important for myotube formation and such a role is novel for these two proteins. We have previously shown that FGF1 is required for myoblast differentiation [4]. Thus the effect of hnRNPM and/or $p54^{nrb}$ knockdown on myoblast differentiation may be a direct consequence of FGF1 downregulation. Alternatively, hnRNPM and $p54^{nrb}$ may act on the expression of additional IRES-containing genes, including Smad5 and utrophin A IRESs whose activities have been reported in myoblasts [17, 52, 53]. It will be of great interest to investigate the possible role of hnRNPM and $p54^{nrb}$ in the promoter-dependent regulation of such IRESs during muscle development.

As seen with the coordination of transcription and mRNA processing, such as splicing, whose regulators often exhibit the additional function of ITAFs (i.e. hnRNPs), one can expect that the promoter-dependent translation mechanism described in our study will extend to other IRES-containing mRNAs. Such a mechanism becomes more significant for genes that are induced in response to conditions that block cap-dependent translation, such as stress. Coupling of IRES activation with the promoter guarantees that the induction of a given gene in response to a specific stimulus will result in the synthesis of that gene product.

Supporting Information

S1 File. Identification of RNA and DNA binding proteins by BIA-MS. Total or nuclear extracts of differentiating C2C12 myoblasts were injected (see Fig 1) as analytes in several BIA-CORE 3000 channels after immobilization of ligands corresponding to FGF1 IRES A, EMCV IRES, FGF1 promoter A or CMV promoter. Bound proteins were recovered as described in Mat. & Meth. and identified by mass spectrometry. For each BIA-MS experiment, 6 recovery cycles were pooled to obtain a sufficient RU quantity (about 2000 RU). Mass spectrometry analysis was performed as described in Mat. & Meth. Bound proteins (RNA and DNA binding proteins) are listed here, (Table A) FGF1 IRES RNA, C2C12 total extracts, (Table B) FGF1 IRES RNA, C2C12 nuclear extracts, (Table C) EMCV IRES RNA, C2C12 total extracts, (Table D) FGF1 promoter A DNA, C2C12 nuclearFGF1 extracts. (DOC)

S2 File. Knockdown of hnRNPM and/or $p54^{nrb}$. C2C12 cells were first transfected with bicucuronic plasmids and 48h later with siRNAs targeting hnRNPM (siM), $p54^{nrb}$ (siP54) or control (sic). RNA levels and luciferase activities are presented in Figs 3 and 4, respectively, from C2C12 myoblasts maintained in proliferation or at day 2 of differentiation. $p54^{nrb}$ and hnRNPM expression was analysed by Western blot following single knockdown with siRNA siM (Fig A) or siP54 (Fig B) or double knockdown with the two siRNAs together (Fig C). (TIF)

S3 File. Effect of hnRNPM and/or $p54^{nrb}$ knockdown on the regulation of FGF1 IRES A using siRNAs different from the smartpool. C2C12 cells co-transfected with bicistronic plasmids and 48h later with a siRNA against hnRNPM (siM), $p54^{nrb}$ (sip54) or siRNA control (sic). SiM and sip54 corresponded to sequences different from that of the siRNA smartpools used in Fig 3. (Fig A) Ratio of the luciferase activities measured as in Fig 3, two days after siRNA transfection, from differentiating C2C12 myoblasts (day 2). (Fig B) The knockdown was checked by Western blot as in S2 File. (TIF)

S4 File. Effect of hnRNPM and $p54$ knockdown on FGF1 IRES activity after DNA or RNA transfection. (Table A) C2C12 cells were transfected with bicistronic plasmids containing the FGF1 promoter and IRES (see Fig 6) and with siRNA siM, sip54 or sic. (Table B) C2C12 cells were transfected with siRNA siM, sip54 or sic and 24h later with bicistronic mRNA containing the FGF1 IRES (see Fig 6). mRNAs were transcribed in vitro, capped and polyadenylated, as described in Mat. & Meth. For Tables A and B, firefly and *renilla* luciferase activities were measured. Values are presented as well as the LucF/LucR (F/R) ratio representing the IRES activity. Experiments were performed in biological triplicates and repeated three times. The Student test was used (mean \pm standard deviation). (DOC)

Acknowledgments

We thank J.J. Maoret (Genotoul quantitative transcriptomics facility), B. Montxarrat (Genotoul Proteomics facility), P. Billon, N. Fenie, J.B. Mauroux, J. Mermet and M. Serrero for technical assistance. This work was supported by Association Française contre les Myopathies (AFM), Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue pour la Recherche Contre le Cancer, Cancéropole GSO, INCA, Fondation de l'Avenir, Région Midi-Pyrénées, European funding (FEDER), N.A. and E.R.G. had a fellowship from AFM, F.H. from the Région Midi-Pyrénées.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EB AP BGS ACP. Performed the experiments: NA FH ERG MB FL FP RP CP. Analyzed the data: NA FH ERG MB RP EB CP OBS BGS ACP. Contributed reagents/materials/analysis tools: ACP. Wrote the paper: NA FH ERG AP BGS ACP.

References

1. Braunschweig U, Querousio S, Plock AM, Graveley BF, Blencowe BJ. Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell*. 2013 Mar 14; 152(6):1252–68. PMID: 23490000. Pubmed Central PMCID: 3642998. Epub 2013/03/19. eng. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.034
2. Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*. 2002 Apr 4; 416(6880):499–506. PMID: 11932736.
3. Pandit S, Wang D, Fu XD. Functional integration of transcriptional and RNA processing machineries. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Jun; 20(3):260–5. PMID: 18456496. doi: 10.1016/j.cpb.2008.03.001
4. Conte C, Ainaoui N, Delluc-Clavieres A, Khoury MP, Azar R, Pujol F, et al. Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription-translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Res*. 2009 Sep; 37(16):5267–78. PMID: 19561106. doi: 10.1093/nar/gkp550
5. Madjar F, Hackshaw KV, Chiu BM. Characterization of the entire transcription unit of the mouse fibroblast growth factor 1 (FGF-1) gene. Tissue-specific expression of the FGF-1 A mRNA. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23; 274(17):11937–44. PMID: 10207015.

6. Myers RL, Chedid M, Tronick SR, Chiu IM. Different fibroblast growth factor 1 (FGF-1) transcripts in neural tissues, glioblastomas and kidney carcinoma cell lines. *Oncogene*. 1995 Aug 17; 11(4):785–9. PMID: 7544453.
7. Myers RL, Payson RA, Chotani MA, Deaven LL, Chiu IM. Gene structure and differential expression of acidic fibroblast growth factor mRNA: identification and distribution of four different transcripts. *Oncogene*. 1993 Feb; 8(2):341–9. PMID: 7678925.
8. Chotani MA, Chiu IM. Differential regulation of human fibroblast growth factor 1 transcripts provides a distinct mechanism of cell-specific growth factor expression. *Cell Growth Differ*. 1997 Sep; 8(9):999–1013. PMID: 9300162.
9. Chotani MA, Payson RA, Winkles JA, Chiu IM. Human fibroblast growth factor 1 gene expression in vascular smooth muscle cells is modulated via an alternate promoter in response to serum and phorbol ester. *Nucleic Acids Res*. 1995 Feb 11; 23(3):434–41. PMID: 7533402. Pubmed Central PMCID: 306594. Epub 1995/02/11. eng.
10. Payson RA, Chotani MA, Chiu IM. Regulation of a promoter of the fibroblast growth factor 1 gene in prostate and breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1998 Aug; 66(3):93–103. PMID: 9719443. Epub 1998/08/27. eng.
11. Martineau Y, Le Bec C, Morillon L, Allé V, Chiu IM, Danos O, et al. Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol*. 2004 Sep; 24(17):7622–35. PMID: 15314170.
12. Baird SD, Lewis SM, Turcotte M, Holcik M. A search for structurally similar cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(14):4664–77. PMID: 17591613.
13. Bonnal S, Schaeffer C, Creancier L, Clamens S, Moine H, Prats AC, et al. A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10; 278(41):39330–6. PMID: 12857733.
14. Morloisse F, Kuchnio A, Frainay C, Gomez-Brouchet A, Delisle MB, Marzi S, et al. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1alpha-independent translation-mediated mechanism. *Cell reports*. 2014 Jan 16; 6(1):155–67. PMID: 24388746. Epub 2014/01/07. eng. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.011.
15. Braunstein S, Karpishcheva K, Pola C, Goldberg J, Hochman T, Yee H, et al. A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol Cell*. 2007 Nov 9; 28(3):501–12. PMID: 17996713.
16. Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Apr; 6(4):318–27. PMID: 15803138.
17. Shiozaki K, Ohsawa C, Sugii N, Wakiyama M, Miura K, Watanabe M, et al. Internal ribosome entry site-mediated translation of Smad5 in vivo: requirement for a nuclear event. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jul 1; 30(13):2851–61. PMID: 12067169. Pubmed Central PMCID: 117063. Epub 2002/06/28. eng.
18. Stoneley M, Subkhankulova T, Le Queine JP, Coldwell MJ, Jopling CL, Belsham GJ, et al. Analysis of the c-myc IRES: a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res*. 2000 Feb 1; 28(3):687–94. PMID: 10537319.
19. Garcia-Blanco MA, Jamison SF, Sharp PA. Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev*. 1989 Dec; 3(12A):1674–86. PMID: 2533576.
20. Jang SK, Wimmer E. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev*. 1990 Sep; 4(9):1560–72. PMID: 2174810.
21. Kim YK, Hahn B, Jang SK. Polypyrimidine tract-binding protein inhibits translation of bip mRNA. *J Mol Biol*. 2000 Nov 24; 304(2):119–30. PMID: 11080430.
22. Mitchell SA, Spriggs KA, Coldwell MJ, Jackson RJ, Willis AE. The Apol-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol Cell*. 2003 Mar; 11(3):757–71. PMID: 12667457.
23. Pickering BM, Mitchell SA, Evans JR, Willis AE. Polypyrimidine tract binding protein and poly (C) binding protein 1 interact with the BAG-1 IRES and stimulate its activity in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jan 15; 31(2):639–46. PMID: 12527772.
24. Bonnal S, Pélaur F, Orsini C, Parker F, Pujol F, Prats AC, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J Biol Chem*. 2006 Feb 11; 281(5):4144–53. PMID: 16325641.

25. Evans JR, Mitchell SA, Spriggs KA, Ostrowski J, Bomsztyk K, Osterek D, et al. Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2003 Sep 11; 22(39):8012–20. PMID: [12970748](#)
26. Holcik M, Gordon BW, Korneluk RG. The internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic protein XIAP is modulated by the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2. *Mol Cell Biol*. 2003 Jan; 23(1):280–8. PMID: [12402911](#)
27. Lin JC, Hsu M, Tam WY. Cell stress modulates the function of splicing regulatory protein RBM4 in translation control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 13; 104(7):2235–40. PMID: [17284590](#)
28. Spriggs KA, Bushell M, Mitchell SA, Willis AE. Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ*. 2005 Jun; 12(6):585–91. PMID: [15900315](#)
29. Jo OD, Martin J, Bernath A, Masri J, Lichtenstein A, Gera J. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 regulates cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site function through Akt signaling. *J Biol Chem*. 2008 Aug 22; 283(34):23274–87. PMID: [1852319](#). Pubmed Central PMCID: 2516998. Epub 2008/06/20. eng. doi: [10.1074/jbc.M801185200](#)
30. Lewis SM, Veyrier A, Hosszu Ungureanu N, Bonnal S, Vagner S, Holcik M. Subcellular relocalization of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Mol Biol Cell*. 2007 Apr; 18(4):1302–11. PMID: [17267289](#)
31. Roy R, Dune D, Li H, Liu BQ, Skshel JM, Mauri F, et al. hnRNP A1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/56K2 signaling. *Nucleic Acids Res*. 2014 Nov 10; 42(20):12483–97. PMID: [25324300](#). Pubmed Central PMCID: 4227786. Epub 2014/10/18. eng. doi: [10.1093/nar/gku353](#)
32. Lopez F, Pichereaux C, Burlet-Schiltz O, Pradayrol L, Monsarrat B, Esteve JP. Improved sensitivity of biomolecular interaction analysis mass spectrometry for the identification of interacting molecules. *Proteomics*. 2000 Apr; 3(4):402–12. PMID: [10697006](#)
33. Datar KV, Dreyfuss G, Swanson MS. The human hnRNP M proteins: identification of a methionine/arginine-rich repeat motif in ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res*. 1993 Feb 11; 21(3):439–46. PMID: [8341656](#)
34. Dong B, Horowitz DS, Kobayashi R, Krainer AR. Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54^{nrb}, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and Drosophila NONA/BJO. *Nucleic Acids Res*. 1993 Aug 25; 21(17):4085–92. PMID: [8371983](#). Pubmed Central PMCID: 310009. Epub 1993/08/25. eng.
35. Fraix AC, Van den Berghe L, Rayssac A, Ahrasoui N, Morfollise F, Pujol F, et al. CXCL12-1/fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Mitochondrial research*. 2013 Jun 4. PMID: [23747987](#). Epub 2013/06/12. Eng.
36. Bouyssie D, Gonzalez de Peredo A, Mouton E, Albignat R, Roussel L, Ortega N, et al. Mascot file parsing and quantification (MFPaQ), a new software to parse, validate, and quantify proteomics data generated by LC-MS/MS and SILAC mass spectrometric analyses: application to the proteomics study of membrane proteins from primary human endothelial cells. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2007 Sep; 6(9):1621–37. PMID: [17533220](#). Epub 2007/05/30. eng.
37. Basu A, Dong B, Krainer AR, Howe CC. The intracisternal A-particle proximal enhancer-binding protein activates transcription and is identical to the RNA- and DNA-binding protein p54^{nrb}/NonO. *Mol Cell Biol*. 1997 Feb; 17(2):677–86. PMID: [9001221](#)
38. Emil A, Shales M, McCracken S, Xie W, Tucker PW, Kobayashi R, et al. Splicing and transcription-associated proteins PSF and p54^{nrb}/nonO bind to the RNA polymerase II CTD. *Rna*. 2002 Sep; 8(9):1102–11. PMID: [12385429](#)
39. Hovhannisyan RH, Carstens RP. Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons. *J Biol Chem*. 2007 Dec 14; 282(50):36265–74. PMID: [17952601](#)
40. Marko M, Leichter M, Patrinoiu-Georgoula M, Gualis A. hnRNP M interacts with PSF and p54^{nrb} and co-localizes within defined nuclear structures. *Exp Cell Res*. 2010 Feb 1; 316(3):390–400. PMID: [19874820](#). doi: [10.1016/j.yexcr.2009.10.021](#)
41. Dobbyn HC, Hill K, Hamilton TL, Spriggs KA, Pickering BM, Coldwell MJ, et al. Regulation of BAG-1 IRES-mediated translation following chemotoxic stress. *Oncogene*. 2008 Feb 14; 27(8):1167–74. PMID: [17700523](#)
42. Lewis SM, Holcik M. For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene*. 2008 Feb 14; 27(8):1030–5. PMID: [17767196](#)
43. Semler BL, Waterman ML. IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes. *Trends Microbiol*. 2008 Jan; 16(1):1–5. PMID: [18083033](#)


44. Jain RA, Gavis ER. The *Drosophila* hnRNP M homolog Rumpelstiltskin regulates nanos mRNA localization. *Development*. 2008 Mar; 135(5):873–82. PMID: 18334721. doi: 10.1242/dev.015438
45. Kameoka S, Duques P, Konarska MM. p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *Embo J*. 2004 Apr 21; 23(8):1782–91. PMID: 15067225.
46. Cobbold LC, Spriggs KA, Haines SJ, Dobbyn HC, Hayes C, de Moor CH, et al. Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-trans-acting factors for the Myo family of IRESs. *Mol Cell Biol*. 2008 Jan; 28(1):40–9. PMID: 17967890.
47. Vera M, Paré B, Griffiths LA, Muchardt C, Abbott CM, Singer RH, et al. The translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response. *eLife*. 2014; 3:e03164. PMID: 25223275. Pubmed Central PMCID: 4164936. Epub 2014/09/19. eng. doi: 10.7554/eLife.03164
48. Michelotti EF, Michelotti GA, Aronson AI, Levens D. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol Cell Biol*. 1996 May; 16(5):2350–60. PMID: 8628302
49. Xodo L, Páramasivam M, Membrino A, Cogol S. Protein hnRNP A1 binds to a critical G-rich element of KRAS and unwinds G-quadruplex structures: implications in transcription. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 2008 (52):159–60. PMID: 18776302
50. Liase TS, Védivel K, Bajaj SP, Chun RF, Hewison M, Adams JS. The heterodimeric structure of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 dictates 1,25-dihydroxyvitamin D-directed transcriptional events in osteoblasts. *Bone research*. 2014; 2. PMID: 25506471. Pubmed Central PMCID: 4261231. Epub 2014/12/17. Eng.
51. Třátek T, Larson DR, Mordon A, Quéry CC, Singer RH. Single-molecule mRNA decay measurements reveal promoter-regulated mRNA stability in yeast. *Cell*. 2011 Dec 23; 147(7):1464–97. PMID: 22196726. Pubmed Central PMCID: 3266490. Epub 2011/12/27. eng. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.051
52. Miura P, Coriati A, Belanger G, De Repentigny Y, Lee J, Kothary R, et al. The utrophin A 5'-UTR drives cap-independent translation exclusively in skeletal muscles of transgenic mice and interacts with eEF1A2. *Hum Mol Genet*. 2010 Apr 1; 19(7):1211–20. PMID: 20063676. doi: 10.1093/hmg/ddp281
53. Miura P, Thompson J, Chakkalakal JV, Holcik M, Jasmin BJ. The utrophin A 5'-untranslated region confers internal ribosome entry site-mediated translational control during regeneration of skeletal muscle fibers. *J Biol Chem*. 2005 Sep 23; 280(38):32997–3005. PMID: 16051462

Résultats : Chapitre 1 Traduction promoteur-dépendante de l'IRES de FGF1 contrôlée par p54^{nrb} et hnRNPM au cours de la différenciation des myoblastes

A: BIA-MS data: total C2C12 extract proteins bound to the FGF1 IRES A RNA.

AC	ID	Description	MW	pI	Score	Peptides	Protein Coverage (%)
P20152	VIME_MOUSE	Vimentin	53655.06	5.06	400.67	27	52.4
P62737	ACTA_MOUSE	Actin. aortic smooth muscle	41981.81	5.23	270.48	15	10.1
P60710	ACTB_MOUSE	Actin. cytoplasmic 1	41709.73	5.29	258.1	15	10.2
P99024	TBB5_MOUSE	Tubulin beta-5 chain	49638.97	4.78	120.76	5	2.9
P62908	RS3_MOUSE	40S ribosomal protein S3	26657.41	9.68	112.42	6	11.4
P62264	RS14_MOUSE	40S ribosomal protein S14	16262.53	10.07	88.8	2	10.5
P31001	DESM_MOUSE	Desmin	53465.04	5.21	87.77	5	1.8
P43277	H13_MOUSE	Histone H1.3	22086.13	11.03	85.81	6	4.7
P43274	H14_MOUSE	Histone H1.4	21964.02	11.1	84.73	5	21.9
Q8BFZ3	ACTBL_MOUSE	Beta-actin-like protein 2	41976.99	5.3	76.41	8	20.5
Q9D0E1	HNRPM_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	77597.38	8.8	72.2	15	17
P10126	EF1A1_MOUSE	Elongation factor 1-alpha 1	50082.1	9.1	72.14	6	2.4
P62751	RL23A_MOUSE	60S ribosomal protein L23a	17684.13	10.44	70.52	1	5.3
P99027	RLA2_MOUSE	60S acidic ribosomal protein P2	11643.83	4.42	69.92	5	60
P62852	RS25_MOUSE	40S ribosomal protein S25	13733.7	10.12	65.11	4	22.4
P15331	PERI_MOUSE	Peripherin	54234.59	5.4	63.83	3	1.1
Q922F4	TBB6_MOUSE	Tubulin beta-6 chain	50058.13	4.8	60.29	3	6.7
P10107	ANXA1_MOUSE	Annexin A1	38709.97	6.97	57.9	3	10.7
P16858	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35787.21	8.44	57.42	9	22.5
P62918	RL8_MOUSE	60S ribosomal protein L8	28007.29	11.03	56.28	3	5.1
P17182	ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	47111.21	6.37	53.17	6	11.5
Q07133	H1T_MOUSE	Histone H1t	21527.15	11.71	52.28	3	13.5
P47963	RL13_MOUSE	60S ribosomal protein L13	24290.5	11.54	49.61	2	10.9
P61255	RL26_MOUSE	60S ribosomal protein L26	17247.53	10.55	42.74	2	4.9
P11499	HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	83273.12	4.97	42.71	3	4.8
P43276	H15_MOUSE	Histone H1.5	22562.44	10.91	42.06	4	7.8
Q61937	NPM_MOUSE	Nucleophosmin	32539.81	4.62	41.88	6	18.2
Q9CQN1	TRAP1_MOUSE	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	80158.53	6.25	41.74	1	0.3
Q64475	H2B1B_MOUSE	Histone H2B type 1-B	13943.56	10.31	40.93	3	23
P61358	RL27_MOUSE	60S ribosomal protein L27	15787.75	10.56	37.85	2	9.2
P62900	RL31_MOUSE	60S ribosomal protein L31	14453.93	10.54	36.02	3	12.2
P62806	H4_MOUSE	Histone H4	11360.38	11.36	35.55	2	18.8
P35700	PRDX1_MOUSE	Peroxiredoxin-1	22162.35	8.26	31.21	3	15.1
O08807	PRDX4_MOUSE	Peroxiredoxin-4	31033.14	6.67	31.21	2	2.6
P68369	TBA1A_MOUSE	Tubulin alpha-1A chain	50103.61	4.94	25.46	5	2.5

B: BIA-MS data: nuclear C2C12 extract proteins bound to the FGF1 IRES A RNA.

AC	ID	Description	MW	pI	Score	Peptides	Protein Coverage (%)
P60710	ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1	41709.73	5.29	1487.66	20	15.2
P68033	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	41991.88	5.23	1216.7	19	14.8
							
	OUSE						
Q62093	SFRS2_MOUSE	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	25461.18	11.86	709.72	7	13.1
Q8BFZ3	ACTBL_MOUSE	Beta-actin-like protein 2	41976.99	5.3	591.13	11	30.6
P56480	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56265.47	5.19	561.29	16	47.1
Q99M28	RNPS1_MOUSE	RNA-binding protein with serine-rich domain 1	34187.7	11.85	337.96	5	7.6
Q03265	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59715.59	9.22	230.42	9	21.7
P63038	CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	60917.39	5.91	221.49	6	20.1
P24369	PPIB_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	23698.56	9.56	209.89	10	44.4
Q569Z6	TR150_MOUSE	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	108113.69	10.17	142.45	8	10.8
P19324	SERPH_MOUSE	Serpin H1	46560.2	8.9	111.84	5	17.5
Q52KI8	SRRM1_MOUSE	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	106828.46	11.87	86.78	6	7.9
P62315	SMD1_MOUSE	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	13273.36	11.56	84.79	1	14.1
Q8BG05	ROA3_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	39627.61	9.1	72.53	4	3.4
Q6PDM2	SFRS1_MOUSE	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	27727.81	10.37	71.53	9	16.6
P26369	U2AF2_MOUSE	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	53483.22	9.19	60.31	1	1.1
Q99K48	NONO_MOUSE	p54 ^{nrb} /NONO Non-POU domain-containing octamer-binding protein	54506.42	9.01	56.11	2	1.3
P67984	RL22_MOUSE	60S ribosomal protein L22	14749.77	9.21	55.76	2	17.1
O08810	U5S1_MOUSE	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component EFTUD2	109291.3	4.86	43.05	1	0.2

C: BIA-MS data: total C2C12 extract proteins bound to the EMCV IRES RNA.

AC	ID	Description	MW	pI	Score	Peptides	Protein Coverage (%)
P645534	ACTA2_MOUSE	Actin alpha 2 smooth muscle	16748,18	5,31	76,71	2	13,9
P8603	ACTA_MOUSE	Actin alpha smooth muscle	41981,81	5,23	76,33	3	7,4
P27547	DCD_MOUSE	dermcidin	11276,83	6,08	60,65	1	10

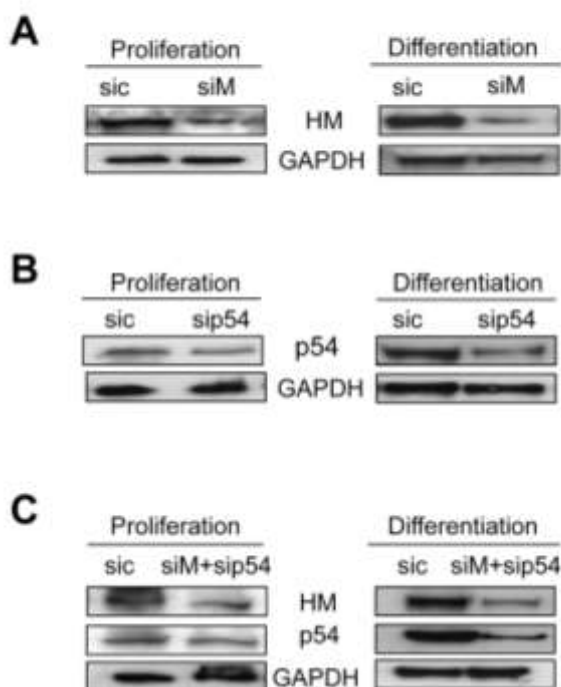
D: BIA-MS data: nuclear C2C12 extract proteins bound to the FGF1 promoter A DNA.

AC	ID	Description	MW	pI	Score	Peptides	Protein Coverage (%)
P03995	GFAP_MOUSE	Glial fibrillary acidic protein	49869.5	5.27	995.36	5	9.5
P60710	ACTB_MOUSE	Actin. cytoplasmic 1	41709.7	5.29	247.21	9	6.9
P63038	CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	60917.4	5.91	209.39	5	1.8
P68033	ACTC_MOUSE	Actin. alpha cardiac muscle 1	41991.9	5.23	195.65	9	6.8
P56480	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56265.5	5.19	192.06	6	20
P11103	PARP1_MOUSE	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	113028	9.05	100.2	2	0.3
O35295	PURB_MOUSE	Transcriptional activator protein Pur-beta	33880.8	5.35	76.87	4	9.6
P19324	SERPH_MOUSE	Serpin H1	46560.2	8.9	69.96	2	9.4
P23475	KU70_MOUSE	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	69440.9	6.35	66.58	2	5.3
P50543	S10AB_MOUSE	Protein S100-A11	11075.5	5.28	64.81	1	15.5
P27641	KU86_MOUSE	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	83004	5.04	59.15	3	6.7
Q99K48	NONO_MOUSE	p54 ^{nrb} /NONO Non-POU domain-containing octamer-binding protein	54506.4	9.01	57.77	1	1
Q03265	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	59715.6	9.22	55.43	2	6.5
Q569Z6	TR150_MOUSE	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	108114	10.17	49.81	5	5.6

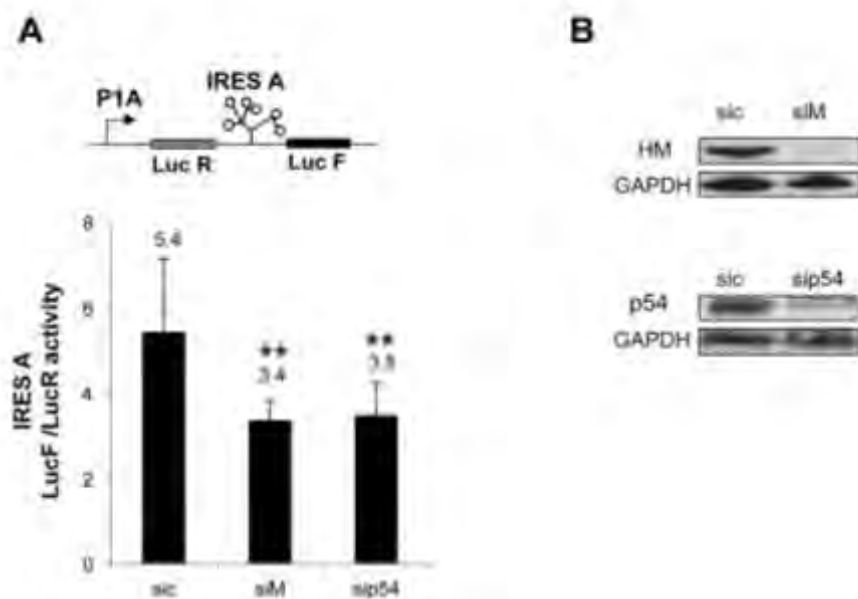
E: BIA-MS data: total C2C12 extract proteins bound to the CMV promoter DNA.

AC	ID	Description	MW	pI	Score	Peptides	Protein Coverage (%)
P21428	ACTA_MOUSE	Actin alpha skeletal muscle	42023.9	5.23	266.7	14	38.7
P3476	ATP-MOUSE	ATP5B ATP synthetase subunit beta mitochondrial	41981.81	5.23	270.48	15	10.1
P29744	SSBP1_MOUSE	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	17249	9.59	204.56	5	32.5
P479743	POTEE_MOUSE	Isoform 1 of POTE ankyrin domain family membre E	121286	5.83	182.01	7	8
P784154	HSPD1_MOUSE	Heat shock protein, mitochondrial	26657.41	9.68	112.42	6	11.4
P7047	S100-A8_MOUSE	S100A8 protein S100-A8	10827.7	6.51	167.34	3	6.8
P3269	ACTBL2_MOUSE	Beta actin-like protein 2	41976	5.39	148.72	6	16.8
P14230	C1QBP_MOUSE	Complement composent 1 Q subcomponent-binding protein mitochondrial	31342.6	19.9	143.06	2	19.9
P27462	S100-A9_MOUSE	S100A9 protein	13233.5	5.71	139.28	6	43
P3935	HT2H2BE_MOUSE	Histone H2B type 2-E	13911.6	10.31	66.47	4	33.3
P7188	SLC25A5_MOUSE	ADP/ATP translocase2	32874.2	9.7	48.84	3	9.7
P291467	SLC25A6_MOUSE	ADP/ATP translocase3	32845.2	9.76	48.84	3	9.7
P440493	ATP5A1_MOUSE	ATP5A1 ATP synthase subunit alpha mitochondrial	59713.6	9.16	47.52	4	9.4
P26272	HT H2A_MOUSE	Histone H2A type 1-B/E	14127	11.05	43.44	1	22.3

Ainaoui-S2 File



Ainaoui- S3 File



Ainaoui-S4 File

A: hnRNPM and p54 knockdown after DNA transfection: FGF1 IRES

Bicistronic vector pP1A-R1AL2 (FGF1 prA + IRES A)	Firefly Luciferase activity	Renilla Luciferase activity	F/R ratio (IRES activity)
<u>Prolifération</u>			
siC	2672600 (±342846)	9420 (±726)	283 (±58)
siM	1796600 (±154452)	9690 (±137)	185 (±14)
siP54	1601300 (±46364)	9735 (±626)	164 (±14)
<u>Différenciation</u>			
siC	10356575 (±668574)	17698 (±1898)	585 (±123)
siM	44860 (±2692)	2875 (±356)	15 (±2.2)
siP54	42060 (±911)	2576 (±297)	16 (±0.8)

B: hnRNPM and p54 knockdown after RNA transfection: FGF1 IRES

Bicistronic mRNA R1AL2 (FGF1 IRES)	Firefly Luciferase	Renilla Luciferase	F/R ratio
<u>Prolifération</u>			
siC	2770 (±29)	4082 (±167)	0.68 (±0.04)
siM	2508 (±91)	3860 (±262)	0.65 (±0.03)
siP54	2770 (±100)	3847 (±243)	0.72 (±0.01)
<u>Différenciation</u>			
siC	1356 (±17)	2455 (±34)	0.55 (±0.004)
siM	1338 (±31)	2417 (±223)	0.55 (±0.05)
siP54	1385 (±50)	1990 (±159)	0.70 (±0.05)

Chapitre 2

Bénéfices thérapeutiques et effets indésirables d'une thérapie génique pro-angiogénique combinée de l'ischémie critique du membre

L'ischémie critique est une forme aggravée de l'artériopathie oblitérante du membre inférieur. Même si les techniques chirurgicales et les traitements médicamenteux ont considérablement amélioré la prise en charge des patients, un grand nombre d'entre eux ne répondent pas à ces thérapies. La revascularisation par transfert de gènes pro-angiogéniques est apparue comme une approche alternative très prometteuse. Face à la complexité du processus d'angiogenèse, il a été démontré que l'utilisation de plusieurs facteurs augmentait le potentiel de la thérapie génique.

Précédemment dans l'équipe, des vecteurs bicistroniques permettant l'expression de deux gènes ont été conçus en utilisant des IRES pour générer plusieurs protéines à partir d'un seul vecteur et d'un seul ARNm, avec un ratio stable entre les molécules et une expression du vecteur à long terme. Cet outil a servi à la conception d'un plasmide bicistronique exprimant les gènes FGF2 et Cyr61 séparés de l'IRES de FGF1. Cet IRES a été choisi pour sa forte activité dans le muscle squelettique, FGF2 pour son fort pouvoir angiogénique et mitogène et Cyr61 pour sa capacité à libérer FGF2 de la matrice extracellulaire pour que ce facteur devienne actif.

Ce plasmide bicistronique a été injecté dans un modèle murin d'ischémie du membre inférieur et a démontré un effet synergique de FGF2 et Cyr61 sur la stimulation de la revascularisation (Rayssac *et al.*, 2009). Les souris utilisées pour cette étude étaient des C57BL/6 hypercholestérolémiques générées par la suppression homozygote de l'apolipoprotéine E (C57BL/6 ApoE^{-/-}).

Nous avons, dans notre étude, confirmé tout d'abord les effets bénéfiques obtenus après électroporation du plasmide thérapeutique dans des souris BALB/C, connues pour leur sensibilité à l'ischémie. Ces souris, contrairement à d'autres souches, ne présentent pas la capacité de reperfusion rapidement et complètement le membre ischémique. La cassette bicistronique a ensuite été transférée dans un AAV pour comparer l'effet à court et long terme de l'expression du transgène sur la revascularisation post-ischémique. Ce vecteur viral a été choisi pour avoir précédemment transduit avec succès le muscle squelettique

ischémique du lapin et de la souris (Jazwa *et al.*, 2013; Kupatt *et al.*, 2010; C. Zhang *et al.*, 2010).

L'AAV est connu pour atteindre une expression maximale du transgène deux à trois semaines après l'injection. Dans le but d'assurer une expression maximale du vecteur au début de l'ischémie, l'AAV thérapeutique a été injecté 21 ou 28 jours avant la chirurgie. De façon inattendue, cela a produit un effet fortement délétère. Le score clinique était pire que celui du groupe contrôle exprimant un vecteur porteur de deux gènes luciférases.

Lorsque l'AAV thérapeutique a été administré au moment de la chirurgie, le score clinique s'est amélioré et l'aire des vaisseaux a significativement augmenté après 21 jours. De plus, le traitement avec l'AAV s'est avéré plus efficace que celui avec le plasmide.

Ces résultats peuvent contribuer à comprendre le succès modéré des traitements pro-angiogéniques dans les essais cliniques de thérapie génique où seuls des vecteurs permettant une expression transitoire ont été utilisés.

Therapeutic Benefits and Adverse Effects of Combined Pro-Angiogenic Gene Therapy in Mouse Critical Leg Ischemia

Benoît Lebas^{1,2,*}, Julien Galley^{1,2,*}, Edith Renaud-Gabardos^{1,*}, Françoise Pujol¹, Françoise Lenfant¹, Barbara Garmy-Susini¹, Xavier Chaufour^{1,2} and Anne-Catherine Prats^{1,§}

¹I2MC, Université de Toulouse, Inserm, UPS, Toulouse, France.

²Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France.

* Equal contribution

§ Corresponding author.

Contact Information: Anne-Catherine Prats, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, 1, Avenue Jean Poulhes, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France (e-mail: Anne-Catherine.Prats@inserm.fr)

Running title: Combined Pro-Angiogenic Gene Therapy in Leg Ischemia

Accepted in Annals Vascular Surgery

Keywords: critical leg ischemia/ therapeutic angiogenesis/ combined gene therapy/ AAV/ FGF2/ Cyr61

ABSTRACT

Objective: Critical leg ischemia (CLI) represents the ultimate stage of peripheral arterial disease. Despite current surgery advances, patients with CLI have limited therapeutic options. Therapeutic angiogenesis thus appears as a powerful approach, aiming to stimulate vessel formation by angiogenic molecules administration. In this context, combined gene therapy has proved the most efficient. The present study aims to compare, in a preclinical mouse model, the therapeutic benefit of a combination of two angiogenic factors FGF2 (fibroblast growth factor 2) and Cyr61 using plasmid and viral vectors, able to generate short or long-term transgene expression in the leg, respectively.

Methods: Two therapeutic genes, FGF2 and Cyr61, were introduced into IRES-based expression vectors (FGFiCyr) allowing co-expression of the two transgenes. The pro-angiogenic plasmid pC-FGFiCyr was assessed by intramuscular administration followed by electrotransfer into ischemic legs. To generate long-term transgene expression, the FGFiCyr bicistronic cassette was introduced into an adeno-associated virus-derived vector (rAAV). The rAAV treatment was performed either before, or immediately after, surgery. Therapeutic effects were analyzed by laser doppler imaging, clinical score and angiography.

Results: The plasmid pC-FGFiCyr improved revascularization, reperfusion and clinical score. Surprisingly, when AAV-FGFiCyr was injected 21 or 28 days before surgery, the pro-angiogenic rAAV was drastically deleterious on all measured parameters. In contrast, when administrated shortly after surgery, AAV-FGFiCyr generated therapeutic benefits, with a significantly better clinical score than after treatment with the plasmid.

Conclusions: Therapeutic effects of the angiogenic combination FGF2-Cyr61 is observed with short term transgene expression, but the treatment is significantly more efficient when a long-term expression viral vector is used. However, the rAAV FGFiCyr generated therapeutic benefit only when injected in an ischemic leg, whereas the same dose of rAAV exhibited deleterious effects when administrated to healthy animals. These data may contribute to the understanding of the moderate success of pro-angiogenic treatments in CLI gene therapy clinical assays.

ABBREVIATIONS

AAV: adeno-associated virus

CLI: critical leg ischemia

CMV: cytomegalovirus

FGF: fibroblast growth factor

HGF: hepatocyte growth factor

IRES: internal ribosome entry site

LDI: laser Doppler imaging

PAD: peripheral arterial disease

VEGF: vascular endothelial growth factor

1/ INTRODUCTION

Critical leg ischemia (CLI) represents the ultimate stage of peripheral arterial disease (PAD), with an incidence between 500 and 1000/million of inhabitants in European and North-American population. This pathology touches men three times more often than women. Despite the progress of surgical and endovascular techniques, patients with CLI have limited therapeutic options, one of which is often amputation.

In such a context, therapeutic angiogenesis appears to be a powerful approach, aiming to stimulate the formation of mature vessels by the administration of angiogenic molecules. Several studies report the use of gene therapy to generate angiogenesis (1). In that context, angiogenic factors including vascular endothelial growth factor (VEGFA), fibroblast growth factors 1 and 2 (FGF1 and FGF2) or hepatocyte growth factor (HGF) have been tested in clinical trials. The therapeutic benefits have been variable, HGF being the most successful but still not sufficient to reestablish the vascular network in ischemic limbs (2).

Currently, clinical assays of gene therapy of CLI use plasmids or adenoviral vectors delivered by intramuscular or intra-arterial administration. Plasmids exhibit the disadvantage of transient expression, resulting in a low gene transfer efficiency, whereas adenoviral vectors are highly immunogenic. Such defaults suggest that the use of adeno-associated virus (AAV) derived vector could result in better benefits. Recombinant AAVs (rAAV) have been used successfully in preclinical assays in a rabbit leg ischemia model (1).

An attractive approach to improve the benefits of therapeutic angiogenesis in CLI gene therapy is provided by combined gene therapy. In a physiological situation, the development of functional vessels requires cooperation between several angiogenic growth factors, whereas the currently reported gene therapy approaches use only one angiogenic growth factor. This may generate an imbalance in the ratio of the different angiogenic growth factors necessary to stimulate formation of functional blood vessels. The concept of combined gene therapy has been validated by several studies (3). A few years ago, we showed a synergistic effect of FGF2 and Cyr61 in the treatment of mouse leg ischemia, using an IRES-based bicistronic vector (FGFiCyr). This previous report has shown that plasmid electrotransfer allows a more efficient therapeutic angiogenesis as well as a decrease in clinical signs when FGF2 and Cyr61 are co-expressed at low doses, compared to moderate effect of these growth factors alone, although expressed at high doses (4). In addition to these therapeutic benefits, the bicistronic plasmid generates no side effects on tumoral angiogenesis, in contrast to the monocistronic vector expressing huge doses of Cyr61.

The genetic background has a major influence on the mouse ability to respond to ischemia and generate physiological angiogenesis and arteriogenesis. Femoral artery ligation has only few consequences on wild type C57BL/6 mouse lineage. Limb complete reperfusion is restored between three and seven days after surgery (5). In an attempt to mimic human atherosclerosis, hypercholesterolemic C57BL/6 mice have been generated by homozygous knock down of apolipoprotein E (ApoE) (5). That model was used to show the synergistic effect of FGF2 and Cyr61 in the study mentioned above (4). However, the BALB/c model has been characterized for its sensitivity to ischemia associated to incomplete ability of ischemic leg reperfusion, thus this model was chosen in the present study to assess the efficiency of the FGF₂Cyr cassette on therapeutic angiogenesis (6).

In an attempt to compare short and long-term transgene expression, the FGF₂Cyr bicistronic cassette was introduced into an AAV-derived vector (rAAV). The therapeutic potential of the viral vector was compared to that of the plasmid. Different times of injection before or just after surgery were analyzed (Fig. 1).

2/ MATERIAL AND METHODS

2.1/ Plasmids

Bicistronic plasmids pC-FGF₂Cyr and pC-RiL have been described previously (4). Both contain the CMV promoter and the FGF1 IRES. pC-FGF₂Cyr codes for FGF2 and Cyr61, whereas pC-RiL codes for renilla and firefly luciferases. The AAV vectors were constructed by transferring the bicistronic cassettes FGF₂Cyr and RiL into the pAAV-MCS plasmid as previously described (7).

Naked plasmid DNA (50 µg in 30 µl of sodium chloride solution 0.9%) was injected (300 U, Myjector U-100 insulin, Terumo) into the *tibialis anterior* muscle and electrotransferred as previously described using an ECM 830 electroporator (BTX Division of Genetronics, Inc., San Diego, CA USA) .

2.2/ AAV production

AAV production was performed by the vectorology plateau of Inserm UMR1037. Serotype 1/2 rAAVs were produced using the tri-transfection procedure using the plasmids pHelper (Stratagene) and pDP1rs (Plasmidfactory), and injected in the mice *tibialis anterior* and *gastrocnemius* skeletal muscles (7). Vector titers were 3.9×10^{11} pfu/mL for AAV-RiL and 0.6 to 1.2×10^{13} pfu/mL for AAV-FGF₂Cyr. rAAV administration to each mouse (100 µL) was divided into four injections: 20 µL were injected in each *tibialis anterior* and 30 µL in each *gastrocnemius*.

2.3/ Animal experimentation

Animal experiments were conducted in accordance with the recommendations of the 'European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes'. All animal experiments were performed according to the INSERM IACUC guidelines for laboratory animals husbandry and have been approved by the "Comité d'Ethique de la Chambre Professionnelle du Conseil Midi-Pyrénées" (protocol No MP/13/27/03/12). C57BL/6 and BALB/c JRJ 10-14 weeks old male mice were used (Janvier, Le Genest St Isle, France).

2.4/ Ischemic leg model

We used the murine leg ischemia model described previously (4). Surgery was performed under general anaesthesia was achieved by intraperitoneal injection of Ketamine (125 mg/kg body weight) and Xylazine (10 mg/kg body weight) solution. The femoral artery was released on its whole length and ligated with Prolène® (8/0 or 7/0). We performed ligation-exeresis of the whole femoral artery (Protocol 1, 2 and 4), or double arterial ligation of the common femoral artery and the sapheno-popliteal junction, the artery being cut between the two ligations (Protocol 3). Skin incision was closed using Prolène 6/0®. Animals were clinically followed every day.

2.5/ Laser Doppler perfusion imaging

Blood flow in both ischemic and nonischemic hindlimbs was measured as previously until day 21 using a PeriScan System blood perfusion monitor laser Doppler equipment (Laser Doppler perfusion imaging system; Perimed, Stockholm, Sweden) (4). Results are expressed as the ratio of perfusion in the ischemic limb versus nonischemic hindlimb.

2.6/ Angiography

Angiographic analysis of collateral vessel development in the ischemic limb was performed by angiography on anesthetized animals as previously described (4). Briefly, after abdominal aorta exposure, a 24G polyethylene catheter (BD, Franklin Lakes, NJ) was used to cannulate the aorta, 5 ml phosphate-buffered saline was injected, followed by 0.5-0.8 ml contrast medium (Micropaque, barium sulfate 1 g/ml; Guerbet, Roissy, France). Angiograms were generated with a Faxitron X-Ray imager (MX-20; Faxitron X-Ray, Lincolnshire, IL). Pixel size was 48 µm. Films were exposed 10 seconds at 22 kV, then numerized for quantitative evaluation using image analysis software Morpho Expert (Explora Nova, La Rochelle, France).

2.7/ Statistical analysis

All statistical analyses were performed using a two-tailed Student's t-test or one-way ANOVA and are expressed as mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3/ RESULTS

3.1/ Therapeutic benefit of BALB/c treatment with the bicistronic plasmid pC-FGF α Cyr.

Before using viral vectors in an attempt to obtain a long-term treatment, the bicistronic plasmid pC-FGF α Cyr, as well as a control plasmid, was administrated to mice just before ligation-exeresis surgery, in order to analyse on BALB/c mice the therapeutic effect of this vector, previously used on C57BL/6 ApoE $^{-/-}$ (4) (Fig. 1A, protocol 1). Plasmid pC-RiL was used as a control. A clinical score of 0 to 6 was established according to the criteria described in Table 1. Following pC-FGF α Cyr injection, the clinical score was improved at day 21 from 3.3 to 2.6 (Fig. 2A). LDI (Laser Doppler Imaging) analysis revealed a more important and faster reperfusion of the ischemic leg in the treated group ($n=6$) compared to the control group ($n=7$), from day 7 to day 21 after surgery (Fig. 2B and 2C). Moreover, angiography data showed an increase of all parameters: vessel area, thickness, length and number of segments (Fig. 2D and 2E).

These data validated the therapeutic effect of the FGF α Cyr transgene in the BALB/c genetic background.

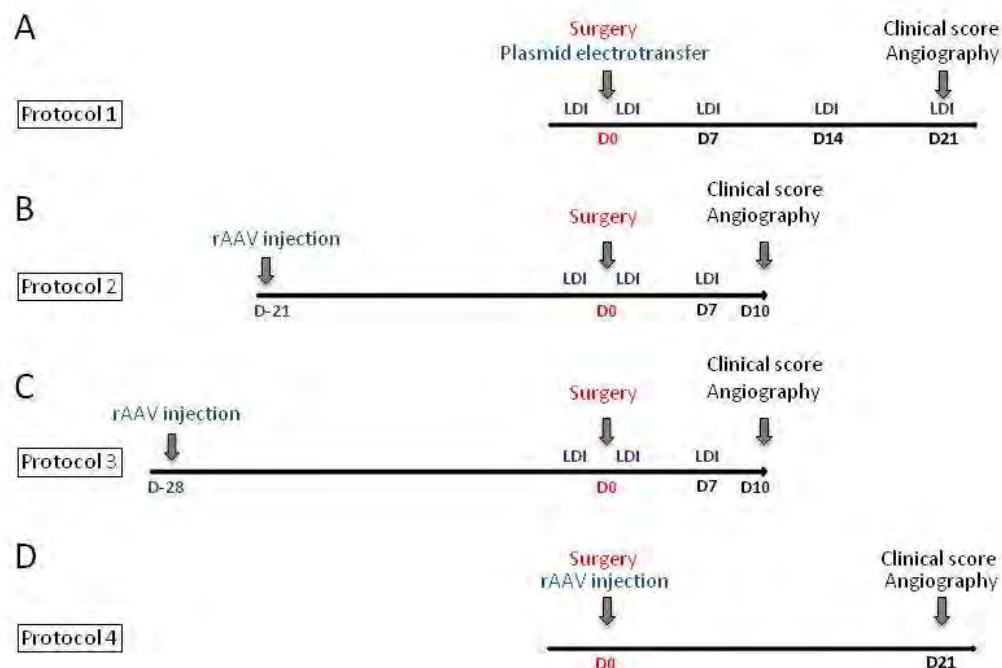


Figure 1. Schema of the four protocols used in the study.

The protocols used in the following figures are schematized (A to D). The black horizontal arrows show the time in days. Day 0 (D0) corresponds to surgery. Times of vector injection, clinical score and angiography are indicated with vertical grey arrows. The different times of Laser Doppler Imaging are indicated (LDI).

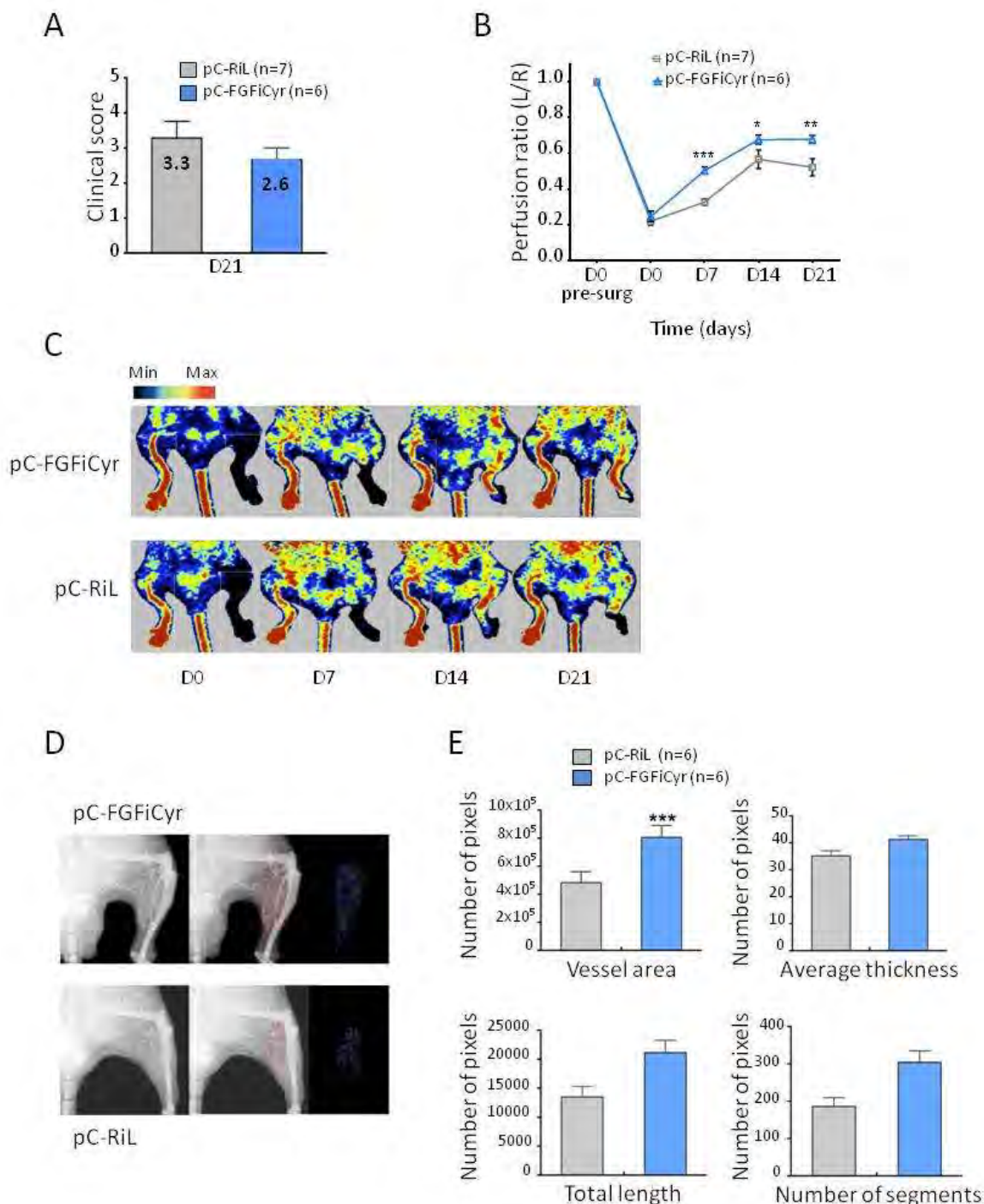


Figure 2. Treatment of ischemic BALB/c mice with the bicistronic plasmid pC-FGFiCyr.

Plasmid pC-FGFiCyr and pC-RiL DNAs were electrotransferred as previously into *tibialis anterior* muscle just before ligation-exeresis surgery (Fig. 1A, protocol 1) (4). A. Clinical score was analysed at day 21 after surgery. B and C. Perfusion was followed by LDI until day 21 post surgery and quantified (B). Imaging is presented for a representative individual. The relative perfusion value is obtained from the ratio of ischemic leg/non ischemic

leg for each individual. D and E. Angiography was performed (D) and vessels quantified using Morphoexpert (E). Different parameters were quantified: vessel area, average thickness, total length and segment number (mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

3.2/ Adverse effect of bicistronic AAV-FGFiCyr administrated prior to surgery.

The rAAVs are currently the most efficient vectors for gene transfer into muscle, and allow long-term expression of transgenes although not integrated in the host genome. The FGFiCyr cassette was transferred into an AAV vector (AAV-FGFiCyr).

The rAAVs are known to reach maximal transgene expression only two or three weeks after injection (8). Thus, in order to ensure a maximal vector expression at the beginning of ischemia, AAV-FGFiCyr and control rAAV were injected into *tibialis anterior* muscles, 21 or 28 days before surgery (Fig. 1B and 1C, protocols 2 and 3). Unexpectedly, the protocol 2 had to be stopped at day 10 after surgery, due to extreme clinical pain (evaluated according to behavior and physiological criteria) of the AAV-FGFiCyr group with a death at day 7 in this group. The LDI analysis showed no benefit for the treated group, whereas the clinical score was worse for the treated group (3.9) than for the control (3.1) (Fig. 3A and 3B). No benefit of the pro-angiogenic treatment was observed on the angiography parameters, despite a strong transgene expression detected by Western blot (Fig. 3C and 3D, Fig. S1).

When vector injection was performed 28 days before surgery (protocol 3), despite the less severe surgery the experiment had again to be stopped at day 10 after surgery, due to clinical pain. Here, the clinical score was significantly worse in the treated group (4.6) than in the control (2.2), while reperfusion did not vary (Fig. 4A and 4B). In addition angiography parameters showed a strong decrease of vessel area, length and segments (Fig. 4C and 4D).

Thus, these data showed an unexpected deleterious effect of the pro-angiogenic treatment with AAV-FGFiCyr, when injected several weeks prior to surgery. This adverse effect was stronger when AAV was injected 28 days (protocol 3), versus 21 days before surgery (protocol 2).

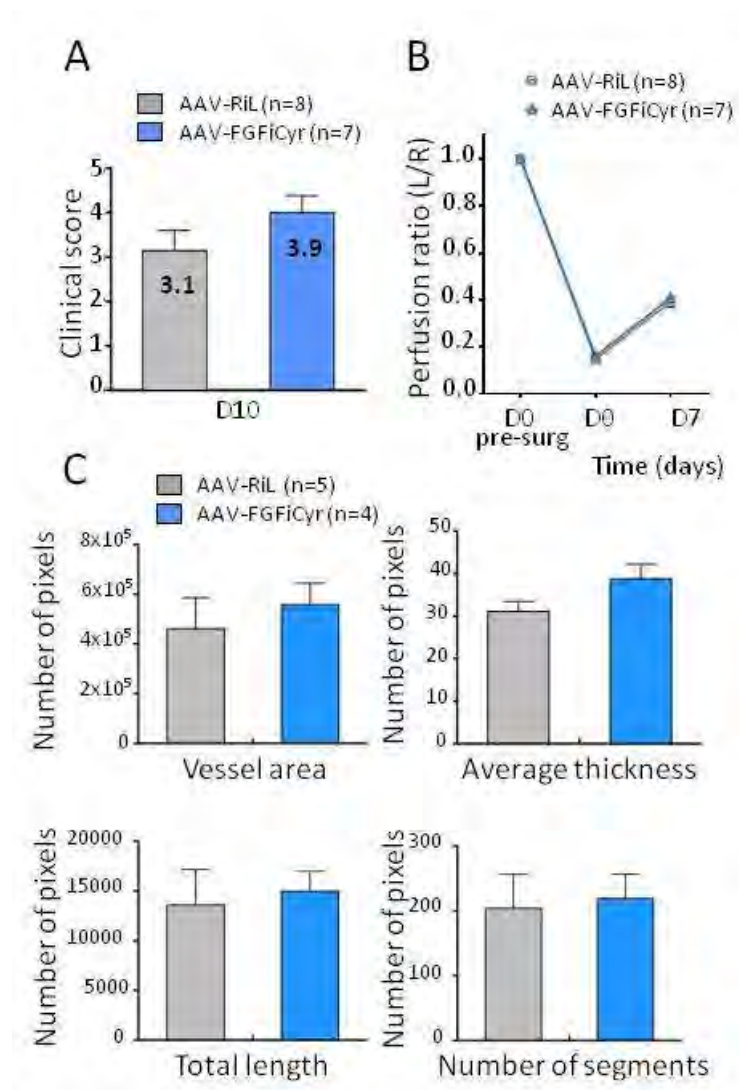


Figure 3. Treatment of ischemic BALB/c mice with the bicistronic vector AAV-FGF1Cyr administrated 21 days before surgery.

AAV-FGF1Cyr and AAV-RiL were injected into *tibialis anterior* muscle. 21 days later, ligature-exeresis surgery was performed and mice were followed as above (Fig. 1B, protocol 2). The protocol had to be stopped at day 10, as the clinical pain of the AAV-FGF1Cyr group was too strong. Clinical score (A), LDI (B) and angiography (C) analyses were performed as in Figure 2.

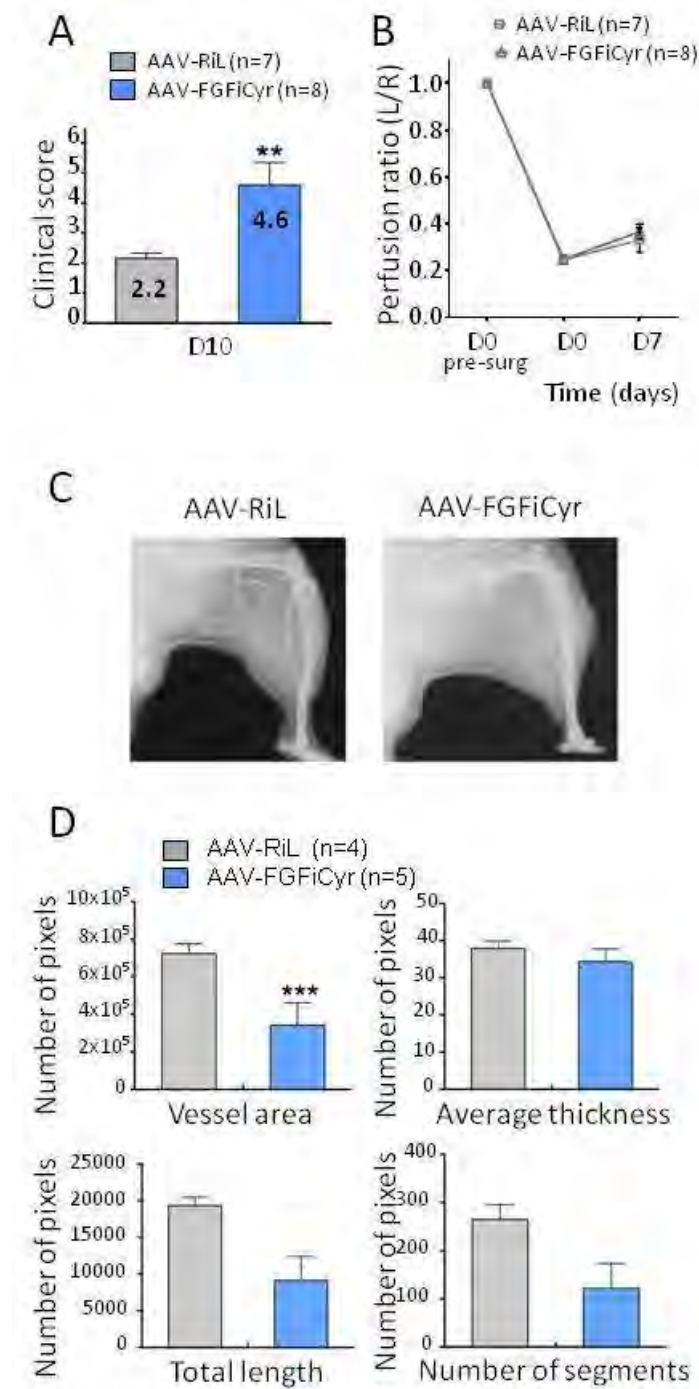


Figure 4. Treatment of ischemic BALB/c mice with the bicistronic vector AAV-FGF1Cyr administrated 28 days before surgery.

AAV-FGF1Cyr and AAV-RiL were injected into *tibialis anterior* muscle. 28 days later, double ligation surgery was performed and mice were followed as above (Fig. 1C, protocol 3). The protocol had to be stopped at day 10, as the clinical pain of the AAV-FGF1Cyr group was too strong. Clinical score (A), LDI (B) and angiography (C and D) analyses were performed as in Figure 2 (mean \pm standard deviation, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.3/ Therapeutic benefit of AAV-FGFiCyr administrated after surgery.

The deleterious effect of AAV-FGFiCyr increased when the vector was injected earlier before surgery (28 versus 21 days, Fig. 3 and 4), suggesting that the time of injection may have an impact on the therapeutic effect of the vector. Thus, a new protocol was designed where the same doses of rAAVs were injected immediately after surgery (Fig. 1D, protocol 4). In this protocol, surgery had to be done in the A2 safety animal facility, preventing the use of the LDI apparatus (located outside). Here, no clinical pain was observed and the groups could be followed until day 21, as for treatment with plasmid. Interestingly, the clinical score was significantly improved (1.8) (Fig. 5A). In addition, angiography revealed a significant increase of vessel area (Fig. 5B and 5C).

These data showed a significant therapeutic benefit of AAV-FGFiCyr, when injected immediately after surgery, with a significant clinical score improvement, superior to that observed with the plasmid pC-FGFiCyr.

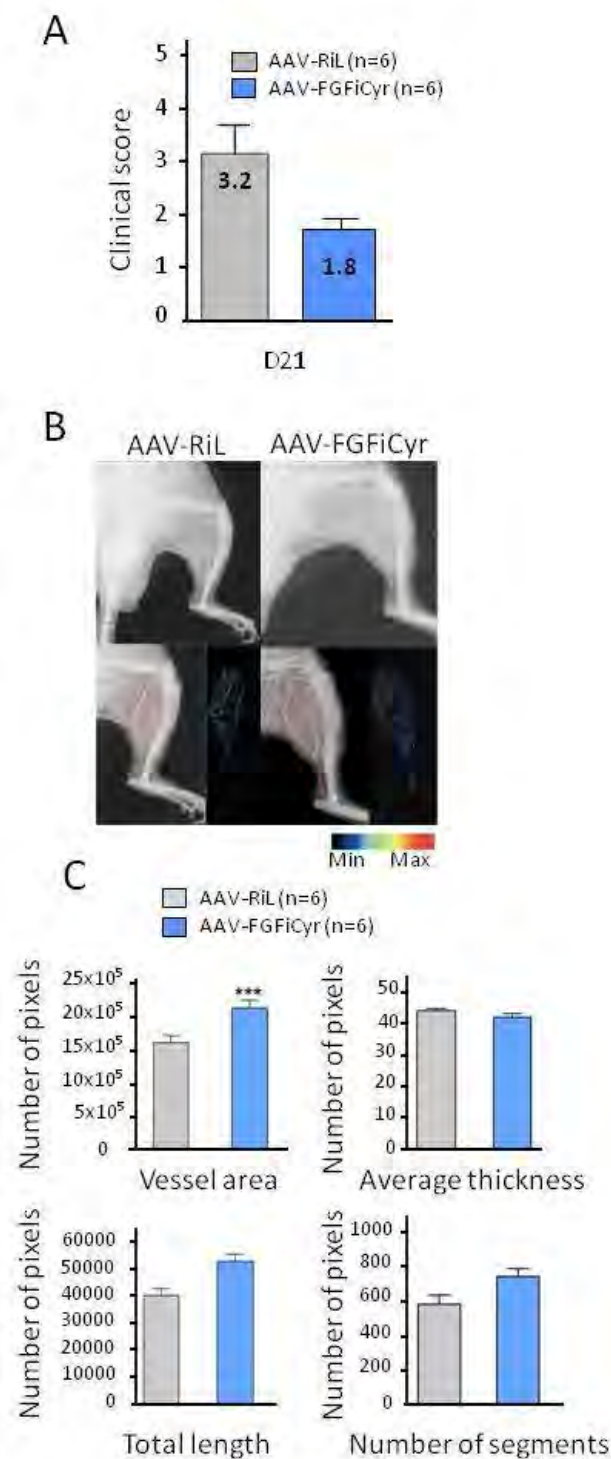


Figure 5. Treatment of ischemic BALB/c mice with the bicistronic vector AAV-FGF1Cyr administered after surgery.

Ligation-exeresis surgery was performed on BALB/c mice. Then, on the same day, AAV-FGF1Cyr and AAV-RiL were injected into *tibialis anterior* muscle (Fig. 1D, protocol 4). AAV-FGF1Cyr was injected at two doses. Clinical score (A) and angiography (B and C) analyses were performed as in Figure 2 (mean \pm standard deviation, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

4/ DISCUSSION

These data show that combined gene therapy in a mouse model of CLI using an rAAV expressing FGF2 and Cyr61, can generate opposite effects, depending on the timing of the injection, either before or after surgery. The pro-angiogenic rAAV exhibited an important therapeutic benefit when injected just after surgery, while it was drastically deleterious when administrated on healthy animals several weeks before surgery.

The cooperative effect of FGF2 and Cyr61, previously reported in C57BL/6 ApoE ^{-/-} was also observed in BALB/c mice with the same bicistronic IRES-based plasmid (4). This shows that the efficiency of the vector pC-FGF₂Cyr is not dependent on the genetic background, suggesting that its therapeutic effect should also be generalizable to other mammalian species. Therefore, this pro-angiogenic vector may be an interesting candidate for a clinical trial in the future.

This mouse model of leg ischemia encounters an important limitation, as it does not really mimic critical limb ischemia in humans: it is a model of acute ischemia whereas the human pathology is chronic ischemia. This issue could be addressed using a mouse model recently validated by Lejay *et al*, using sequential femoral and iliac ligatures in Swiss mice at day 0 and day 4, respectively (9).

The pivotal issue raised by our data is the strong difference of the AAV-FGF₂Cyr therapeutic effect depending on the date of administration relative to surgery. The therapeutic vector AAV-FGF₂Cyr is clearly beneficial on both clinical score and therapeutic angiogenesis when injected immediately post-surgery, whereas it is drastically deleterious when injected several weeks before surgery. This adverse effect is still stronger when injection occurs 28 days versus 21 days before surgery. We propose several hypotheses to explain such an unexpected effect.

A first hypothesis could be that rAAV injection might generate inflammation in the injected leg, resulting in an exacerbated sensitivity to the surgery. However, in such a case, the control rAAV should provide the same clinical profile as the therapeutic AAV. Our data suggest that the deleterious effect of AAV-FGF₂Cyr is related to the angiogenic transgenes FGF2 and Cyr61. This could be due to high doses of growth factors produced by rAAV. However, in a previous report where we used vectors expressing huge amounts of FGF2 or Cyr61, we never observed any deleterious effect of the treatment, although the therapeutic benefit was less important than with the growth factor combination (4). Our data suggest that FGF2 and Cyr61 may have different effects, depending on the basal state of the individual. In particular, the effect of Cyr61 is dependent on its interaction with integrins.

When interacting with $\alpha_v\beta_3$ present on endothelial cells, it induces angiogenesis whereas its interaction with $\alpha_6\beta_1$ expressed by fibroblasts results in apoptosis and cell senescence (10). Integrins may vary in ischemic versus normal legs.

Another interesting hypothesis is that overexpression of angiogenic factors before surgery would disturb the angiogenic balance (11). Treatment of healthy animals with pro-angiogenic factors may trigger expression of anti-angiogenic factors, whose presence, at the time of surgery, would prevent the normal angiogenic response to ischemia. Further investigation is needed to check such a possibility. Nevertheless, these observations indicate that the effect of pro-angiogenic treatments may be dependent on the basal state of the individual. This might also provide an avenue to explain the lack of efficiency of pro-angiogenic treatments in clinical assays of critical limb ischemia gene therapy, contrasting with beneficial effects of the treatments observed on animal models.

5/ CONCLUSION

In conclusion, our data show that an rAAV co-expressing FGF2 and Cyr61 exhibits a significant therapeutic benefit, superior to that of the plasmid vector expressing the same transgenes. However, this benefit is observed only when the pro-angiogenic rAAV is injected in an ischemic situation. Strikingly, the same dose of rAAV was severely deleterious when administered to healthy animals several weeks before surgery. These observations indicate that the effect of pro-angiogenic treatments may be dependent on the basal state of the individual.

6/ ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks go to Y. Barreira, D. Calise and K. Pestourie from the Inserm US006 platform ANEXPLO Genotoul (Toulouse, France) and Loïc van den Berghe from the Inserm UMR1037 vectorology plateau (Toulouse). We also thank F. Cabon and H. Prats for their helpful discussion and M. Tortolano for English proofreading.

This work was supported by Fondation de l'Avenir, Association Française contre les Myopathies (AFM), Association pour la Recherche sur le Cancer, Région Midi-Pyrénées, European funding (REFBIO). E.R.G. had a fellowship from AFM.

7/ REFERENCES

1. Mughal NA, Russell DA, Ponnambalam S, Homer-Vanniasinkam S. Gene therapy in the treatment of peripheral arterial disease. *The British journal of surgery* 2012;99:6-15.
2. Madonna R, Rokosh G. Insights into gene therapy for critical limb ischemia: the devil is in the details. *Vascular pharmacology* 2012;57:10-4.
3. Renaud-Gabardos E., Hantelys F., Morfoisse F., Chaufour X., Garmy-Susini B., Prats A.-C. Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. *World journal of experimental medicine*, 2015;5:11-20.
4. Rayssac A, Neveu C, Pucelle M, Van den Berghe L, Prado-Lourenco L, Arnal JF, et al. IRES-based vector coexpressing FGF2 and Cyr61 provides synergistic and safe therapeutics of lower limb ischemia. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2009;17:2010-9.
5. Couffignal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzenbichler B, Magner M, et al. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice. *Circulation* 1999;99:3188-98.
6. Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, et al. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006;26:520-6.
7. Prats AC, Van den Berghe L, Rayssac A, Ainaoui N, Morfoisse F, Pujol F, et al. CXCL4L1-fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Microvascular research* 2013;89:25-33.
8. Delluc-Clavieres A, Le Bec C, Van den Berghe L, Conte C, Allo V, Danos O, et al. Efficient gene transfer in skeletal muscle with AAV-derived bicistronic vector using the FGF-1 IRES. *Gene therapy* 2008;15:1090-8.
9. Lejay A, Choquet P, Thaveau F, Singh F, Schlagowski A, Charles AL, et al. A new murine model of sustainable and durable chronic critical limb ischemia fairly mimicking human pathology. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2015;49:205-12.
10. Lau LF. CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2011;68:3149-63.
11. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine* 1995;1:27-31.

Lebas Figure S1

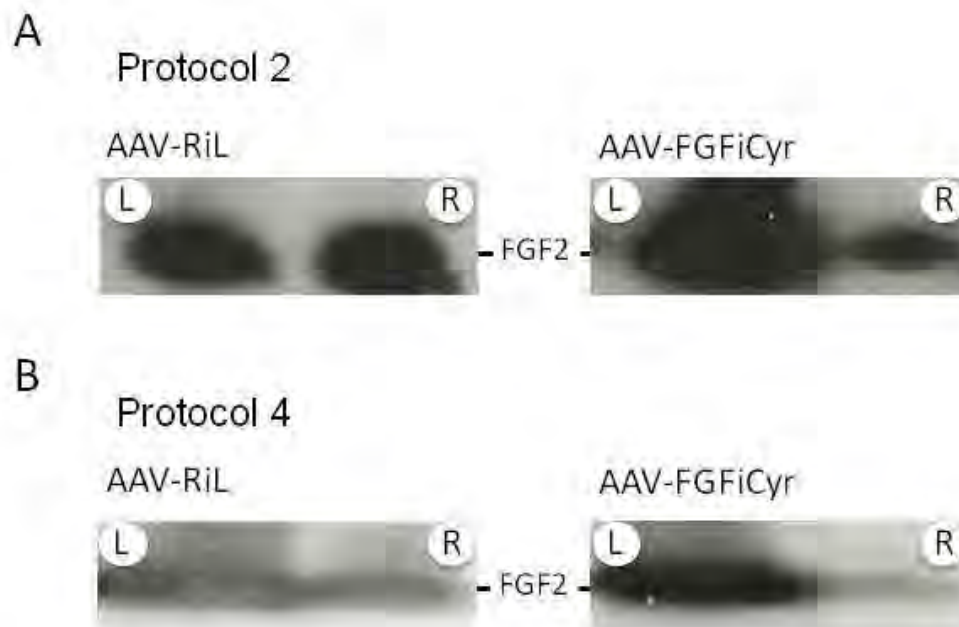


Figure S1. FGF2 expression following treatment of ischemic mice with the rAAVs.

FGF2 expression was analyzed by Western immunoblotting using anti-FGF2 antibody on muscle extracts in protocol 2 (injection 21 days before surgery) and protocol 4 (injection just after surgery).

Whole-muscle protein extracts (obtained after homogenization in Tissue Extraction Reagent I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) of ischemic muscles) were analyzed as previously described (1): 150µg of protein per sample was separated on a 4-20% polyacrylamide gel (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) and electroblotted on nitrocellulose membranes. Western immunoblotting was performed using 1/400 rabbit polyclonal anti-FGF2 (Santa Cruz, FGF-2 (147): sc-79).

For AAV-RiL (control vector) and AAV-FGFiCyr (therapeutic vector), FGF2 expression was analyzed in the left leg (injected) and in the right leg (non injected as a control). The non injected right leg shows endogenous FGF2 expression. 50 ug of proteins was loaded in each lane. For each protocol, the four lanes come from the same blot thus the same exposure.

1. Rayssac A, Neveu C, Pucelle M, Van den Berghe L, Prado-Lourenco L, Arnal JF, et al. IRES-based vector coexpressing FGF2 and Cyr61 provides synergistic and safe therapeutics of lower limb ischemia. *Mol Ther* 2009 Dec;17:2010-9. PubMed PMID: 19738600

Chapitre 3

Bénéfices thérapeutiques et régulation transcriptomique par le transfert de gène combiné d'apeline, FGF2 et SERCA2a dans le cœur ischémique murin

L'insuffisance cardiaque ischémique qui se développe après un infarctus du myocarde est responsable d'une importante morbidité et mortalité. Suivant l'état de santé du patient, les traitements actuels, qu'ils soient médicamenteux ou chirurgicaux, ne permettent pas toujours de soigner cette pathologie. L'angiogenèse thérapeutique, par thérapie génique et/ou cellulaire, est apparue comme une approche prometteuse pour revasculariser et reperfusionner le myocarde ischémique alors que le transfert de gènes cardioprotecteurs est une approche qui a été utilisée dans d'autres études afin de rétablir la fonction contractile du cœur. Jusqu'à ce jour, malgré plusieurs essais cliniques et des phases I/II très prometteuses, la thérapie génique n'a pas démontré de bénéfices thérapeutiques significatifs à l'échelle de plusieurs centaines de patients. Les échecs peuvent être attribués en partie à un transfert de gène inefficace ou à l'utilisation d'un gène unique.

En nous basant sur les résultats encourageants obtenus avec un vecteur à IRES pour le traitement de l'ischémie du membre inférieur, nous avons développé une approche de thérapie génique combinée de l'ischémie cardiaque en développant des lentivecteurs multicistroniques contenant des IRES pour co-exprimer plusieurs gènes thérapeutiques et cibler ainsi plusieurs fonctions altérées ou insuffisantes pour le processus de réparation du myocarde. Le lentivecteur a été choisi car il permet une expression à long terme puisqu'il s'intègre au génome de la cellule hôte, et autorise l'insertion d'une cassette d'expression plus grande que l'AAV. De plus, un lentivecteur SERCA2a a été utilisé avec succès dans un modèle d'ischémie cardiaque chez le rat. Nous avons utilisé l'IRES de FGF1 du fait de sa forte activité dans les cellules musculaires, et parce que nous avons démontré dans l'équipe que cet IRES était activé par l'hypoxie dans des cardiomyocytes HL-1 (Hantelys et coll., en préparation). Dans ce travail de thèse, j'ai avant tout vérifié l'expression du transgène par injection intramyocardique d'un lentivecteur dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque ischémique après ligature d'une branche de l'artère coronaire. J'ai ensuite démontré que l'IRES de FGF1 est plus actif dans le myocarde ischémique que dans les cœurs n'ayant pas subi d'infarctus, confirmant ainsi l'activation de l'IRES par l'hypoxie.

Nous avons, pour ce travail, sélectionné trois gènes pro-angiogéniques et cardioprotecteurs : apeline, FGF2 et SERCA2a. J'ai réalisé différentes constructions de lentivecteurs mono- bi- et tricistroniques, que nous avons utilisé *in vitro* et *in vivo* pour démontrer le potentiel des vecteurs multicistroniques sur le traitement de l'insuffisance cardiaque. *In vitro*, des cardiomyocytes HL-1 ont été transduits par les vecteurs exprimant les deux protéines sécrétées, apeline et FGF2, afin d'utiliser le milieu conditionné pour un test de tubulogenèse des cellules endothéliales. La combinaison bicistronique s'est avérée être la plus efficace démontrant l'effet complémentaire des deux molécules.

In vivo, les lentivecteurs exprimant apeline, apeline-FGF2 ou apeline-FGF2-SERCA2a ont été injectés en phase aiguë de l'infarctus du myocarde. Sept semaines plus tard, lorsque l'insuffisance cardiaque est installée, j'ai regardé l'effet de ces vecteurs sur l'angiogenèse, la fonction cardiaque et le remodelage. J'ai confirmé le pouvoir angiogénique de la combinaison apeline-FGF2. Comme SERCA2a n'intervient pas dans l'angiogenèse, c'est sans surprise que j'ai observé le même effet sur la densité capillaire avec le vecteur tricistronique apeline-FGF2-SERCA2a. Cependant, la présence de SERCA2a jouant un rôle dans la contractilité des cardiomyocytes et connu pour avoir amélioré la fonction cardiaque chez des patients en phase 2a d'un essai clinique, a permis d'augmenter significativement la fraction d'éjection, de diminuer l'hypertrophie du cœur et des cardiomyocytes et de prévenir la fibrose cardiaque.

L'expression génique a été analysée dans les cœurs ischémiques avec ou sans traitement en comparaison aux cœurs sans infarctus, et ce après sept semaines. J'ai pu observer une surexpression ou une répression des gènes pro-angiogéniques et anti-angiogéniques et également une modification de l'expression de gènes impliqués dans le remodelage et la fonction cardiaque, en condition ischémique. Les traitements, en particulier la combinaison apeline-FGF2-SERCA2a, tendent à restaurer l'expression génique vers celle d'un cœur sain.

Ces résultats confirment que la thérapie génique combinée génère une meilleure efficacité dans le traitement de pathologies complexes et ont permis d'identifier le triplet apeline-FGF2-SERCA2a comme une combinaison prometteuse dans une perspective future d'essai clinique.

Therapeutic benefit and transcriptome regulation by combined gene transfer of apelin, FGF2 and SERCA2a into mouse ischemic heart.

Edith Renaud-Gabardos¹, Benoît Lebas^{1,2}, Franksy Hantelys¹, Florence Tatin¹, Denis Calise³, Oksana Kunduzova¹, Bernard Masri¹, Françoise Pujol¹, Pierre Sicard¹, Philippe Valet¹, Jérôme Roncalli^{1,2}, Xavier Chaufour^{1,2}, Barbara Garmy-Susini¹, Angelo Parini¹ and Anne-Catherine Prats^{1§}

¹UMR 1048-I2MC, Inserm, FHU IMPACT, UPS, F-31432 Toulouse, France.

²Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, F-31059 Toulouse, France.

³UMS 006, Inserm, UPS, F-31432 Toulouse, France.

[§]Corresponding author.

Contact information : Anne-Catherine Prats, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, 1, Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France (e-mail: Anne-Catherine.Prats@inserm.fr)

Running title: Combined gene therapy of ischemic heart disease

Key words: ischemic heart disease/ combined gene transfer/ lentivector/ IRES/ apelin/ FGF2/ SERCA2

ABSTRACT

Combination therapies have improved therapeutic benefit in various pathologies. In that context, we designed multicistronic vectors to simultaneously stimulate angiogenesis, prevent cardiac remodeling and restore contractile function in ischemic hearts. Fibroblast growth factor 2 (FGF2), apelin and SERCA2a mono- and multicistronic IRES-based lentivectors were designed and administrated by direct intramyocardial injection into a mouse model of myocardial infarction. Data show that apelin and FGF2 have a cooperative stimulating effect on angiogenesis. The beneficial effect on ischemic heart function was improved by the addition of a third cistron, SERCA2a, which prevents cardiac fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy. Global approach using transcriptome analysis revealed that combined treatment restores the angiogenic balance and expression of genes involved in cardiac function and remodeling. These data reveal the therapeutic benefit of combined gene transfer of apelin, FGF2 and SERCA2a, mediated by the recovery of gene network regulation.

INTRODUCTION

Cardiomyopathies may be acquired or inherited and are examples of life-threatening cardiovascular pathologies that may affect life expectancy of patients. In all cases these diseases affect heart muscle and extracellular environment reducing its ability to pump blood towards the rest of the body. Ischemic heart failure is the most frequent form of cardiomyopathy in Western countries (1). This pathology is characterized by coronary artery occlusions resulting from atherosclerosis. Heart failure, which often develops in patients who survive myocardial infarction, is a debilitating disease with high morbidity and can lead to frequent hospital readmissions (2). Impaired contractile function associated with heart failure can be attributed, in part, to decline in perfusion and to the development of cardiac remodeling that results in myocardial fibrosis (3).

Gene therapy offers important perspectives for the treatment of cardiovascular diseases. As regards ischemic heart failure, recent studies suggest that angiogenic gene therapy can restore perfusion in ischemic myocardial tissue, whereas transfer of non-angiogenic genes may correct defects in calcium handling contributing to abnormal contractile function (2). On the one hand several clinical trials of gene therapy of heart failure based on therapeutic angiogenesis have been reported, using vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) or members of the fibroblast growth factor (FGF) family expressed from plasmids or adenovirus vectors (4, 5). For several trials, the outcome was encouraging but not satisfactory. On the

other hand, very promising data were obtained in a phase IIa trial using a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector expressing the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase SERCA2a (6, 7). However, the phase IIb did not confirm this outcome (8-10). These contradictory results send researchers back to the bench to design new strategies to improve the efficiency and reliability of cardiac gene therapy (11).

For several years, the concept of combined gene therapy has emerged as a possibility to render treatments more efficient (12). Treatments of heart ischemia as well as lower limb ischemia with combined molecules have appeared as a promising approach. As shown by us and others, association of FGF2 with other angiogenic factors, either VEGF, PDGF or Cyr61 and association of VEGF with PDGF or angiopoietin have demonstrated a benefit in the treatment of leg ischemia in animal models (13-17). As well, VEGF associated with PDGF also provides a better therapeutic angiogenesis in heart ischemia than each of these two growth factors separately (15). A bicistronic plasmid expressing VEGF and FGF2 also provided a moderate therapeutic benefit in a clinical assay of heart ischemia (18).

Internal ribosome entry sites (IRESs), RNA elements naturally present in the 5' untranslated regions of a few mRNAs, constitute a powerful tool to co-express several genes of interest (12). IRESs are translational enhancers allowing the translational machinery to start protein synthesis by internal initiation. In addition, IRESs can be considered as specific activators that allow translation initiation to occur in conditions when the classical mechanism of cap-dependent initiation is blocked, as happens in different stress conditions including hypoxia. These features of IRESs allowed the design of multicistronic vectors expressing several genes of interest from a single mRNA. IRESs exhibit tissue specificity, and drive translation in stress conditions, which renders them useful for gene transfer in hypoxic conditions occurring in ischemic diseases and cancer (19-21). Many expression vectors allow co-expression of two genes under the control of two promoters. However such an approach has revealed that one of the genes may be silenced despite the expression of the other one (22). This can result from competition between the two promoters or counterselection of the gene of interest in case of toxicity or cell growth inhibition. We have validated IRES-based multicistronic vectors (rather than the use of two separate vectors or a vector with two promoters) for gene transfer in cultured cells and *in vivo* in mouse muscle, and shown that the use of IRESs permits a better stability of vector expression and a stable ratio of expression of the molecules coded by the vector (22-24). In such a context, IRESs exhibit the advantage of co-expressing transgenes under the control of a single promoter with a stable ratio of the proteins of interest. IRES-based viral and non viral vectors have been used successfully in preclinical and clinical assays of combined gene therapy and resulted in therapeutic benefits

for various pathologies including cancers, cardiovascular diseases and degenerative disorders (12).

In a previous study we have validated the use of an IRES-based vector for the gene transfer of two angiogenic factors from a single vector, and demonstrated that FGF2 and Cyr61 cooperate to generate therapeutic angiogenesis (17). Furthermore the FGF2-Cyr61 bicistronic vector allows the molecules to act more efficiently at low doses, without side effects compared to the monocistronic vector expressing large amounts of each factor alone that stimulates tumor growth (17). Our study on leg ischemia has validated the concept of using IRES-based vectors for combined gene therapy and incited us to transfer this concept to cardiomyopathies.

Here we investigated the potential therapeutical effect of combined administration of factors stimulating angiogenesis and myocardial contractile function in a preclinical mouse model of ischemic heart disease. In addition to factors that have already been used alone to promote angiogenesis (FGF2) and cardiac function (SERCA2a) in gene therapy approaches, we selected the bioactive peptide apelin. This chemokine is of a particular interest as it has multiple positive effects in the heart. Indeed, apelin administration increases myocardial vascular density, decreases cardiomyocytes apoptosis, and finally prevents cardiac fibrosis and ventricular dysfunction (25-30). Our results validated the use of IRES-based lentivector for gene transfer into ischemic heart and revealed the therapeutic benefits of the apelin-FGF2-SERCA2a triplet. Transcriptome analysis of treated and untreated hearts was performed using a Fluidigm Deltagene PCR array, showing that the combined treatment is the most efficient in restoring the regulation of angiogenesis and cardiac remodeling gene networks.

RESULTS

Monocistronic and IRES-based bicistronic lentivectors allow transgene expression in mouse ischemic heart.

Lentivector was selected in the present study as this vector has been successfully used for SERCA2a gene transfer in rat ischemic heart (31). The animal model developed here was heart infarction in C57BL/6J mouse, generated by ligation of left anterior coronary artery (32). In order to evaluate gene transfer efficiency, reporter lentivectors were administrated immediately after infarct by intramyocardial injection, at the border between ischemic and healthy areas (Fig. 1A).

To validate our approach, a monocistronic luciferase lentivector was injected and transgene expression analyzed. Data showed similar luciferase expression in heart extracts 1 and 7

weeks after infarction, as well as in the controls without infarct (Fig. 1B). Luciferase expression was also confirmed by immunohistofluorescence (Fig. 1C).

In a previous report, we have validated the use of the FGF1 IRES for combined gene transfer in skeletal muscle (17). To assess the ability of the FGF1 IRES to drive transgene expression in ischemic heart muscle, we used a bicistronic lentivector coding for two luciferases separated by the FGF1 IRES. In such a construct, the first cistron (renilla luciferase, LucR) reflects the mRNA expression whereas the second cistron (firefly luciferase, LucF) is under the control of the IRES and the LucF/LucR ratio reflects the IRES activity (20). Luciferase activities were measured 7 weeks after infarction in the ischemic area, showing similar LucR activities with or without infarct, whereas the LucF/LucR ratio was superior with infarct (Fig. 1D and 1E).

These data validated the use of IRES-based lentivectors for gene transfer into heart, and confirmed stable transgene expression during weeks. Furthermore, they showed an increased IRES activity in ischemic heart compared to normal heart, indicating that the FGF1 IRES constitutes an adequate tool to drive transgene expression in ischemic heart muscle.

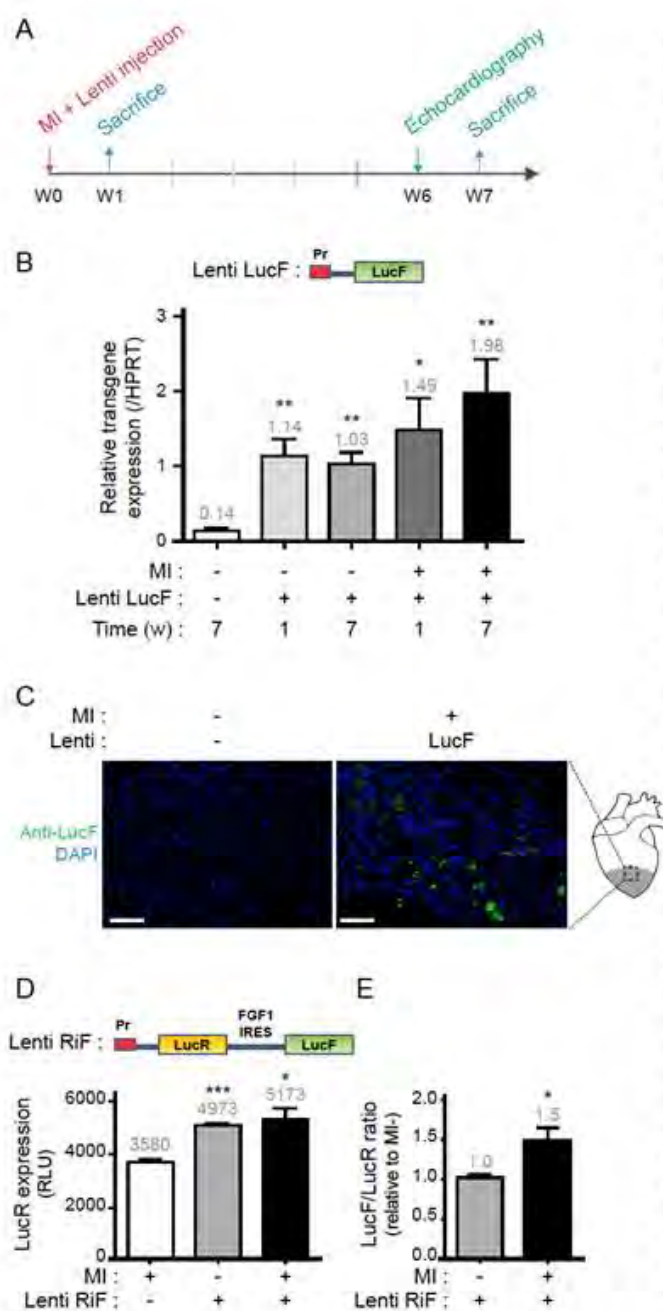


Figure 1. Validation of lentivector transduction into mouse ischemic heart.

A. Schema of the protocol of lentivector injection into mouse ischemic heart model. Myocardial infarction (MI) was generated as described in Mat & Meth by ligation of the left anterior descending coronary artery, and lentivectors were immediately injected at the border between the ischemic area and the healthy area of the myocardium ($2-2.5 \times 10^6$ TU). The black horizontal arrow shows the time in weeks. Week 0 (W0) corresponds to surgery. Times of vector injection, VEVO echocardiography and sacrifice for further analyses are indicated with vertical arrows.

B-C. In order to validate lentivector transduction and stable expression in ischemic heart, a lentivector carrying the luciferase gene LucF (Lenti LucF, schematized above the histogram) was injected as described in Fig. 1A. Mice were sacrificed at 1 or 7 weeks. Total RNA was purified and gene expression measured by RT qPCR using a primer couple targeting the 3'-end sequence of the lentivector cassette. Relative transgene expression is shown as mean \pm standard error of the mean, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (B). Luciferase was detected at 7 weeks in tissue sections of the ischemic area (see schema on the right) by immunostaining with anti-LucF antibody. The scale is indicated with a bar corresponding to 50 μ m. Presence or absence of myocardial infarction (MI) and lentivector transduction (Lenti LucF) are indicated by "+" or "-", respectively (C).

D-E. To validate transgene expression from an IRES-based lentivector in ischemic heart, a bicistronic lentivector carrying *renilla* (LucR) and firefly luciferase genes separated by the FGF1 IRES (Lenti RiF, schematized above the histograms), was administrated to mice as described in Fig. 1A. LucR and LucF activities were measured 7 weeks after injection from extracts of heart ischemic area. LucR activity reflects expression of the first cistron (D), whereas the LucF/LucR ratio reflects the IRES activity, thus expression of the second cistron (E). Presence or absence of myocardial infarction (MI) and lentivector transduction (Lenti RiF) are indicated by "+" or "-", respectively. The value measured in the non-transduced heart corresponds to autoluminescence always observed in blood tissue. LucR activity and LucF/LucR ratio are shown as mean \pm standard error of the mean, * $p<0.05$, *** $p<0.001$ (n=3-7 mice per group).

Apelin and FGF2 have a cooperative effect on endothelial cell tubulogenesis in vitro.

Based on their double angiogenic and cardioprotective potential, apelin and FGF2 were the two first candidates tested in our study for a combined gene therapy (5, 17, 30, 33, 34). Monocistronic and bicistronic lentivectors coding for one or two of these molecules were

produced, and HL-1 mouse cardiomyocytes transduced. Transgene expression was measured by reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT qPCR), indicating that the bicistronic lentivector apelin-FGF2 was 15.3 and 11.3 times less efficiently expressed at the mRNA level than the monocistronic vectors expressing apelin or FGF2, respectively, as already observed in previous reports (Fig. 2A and 2B) (17, 35).

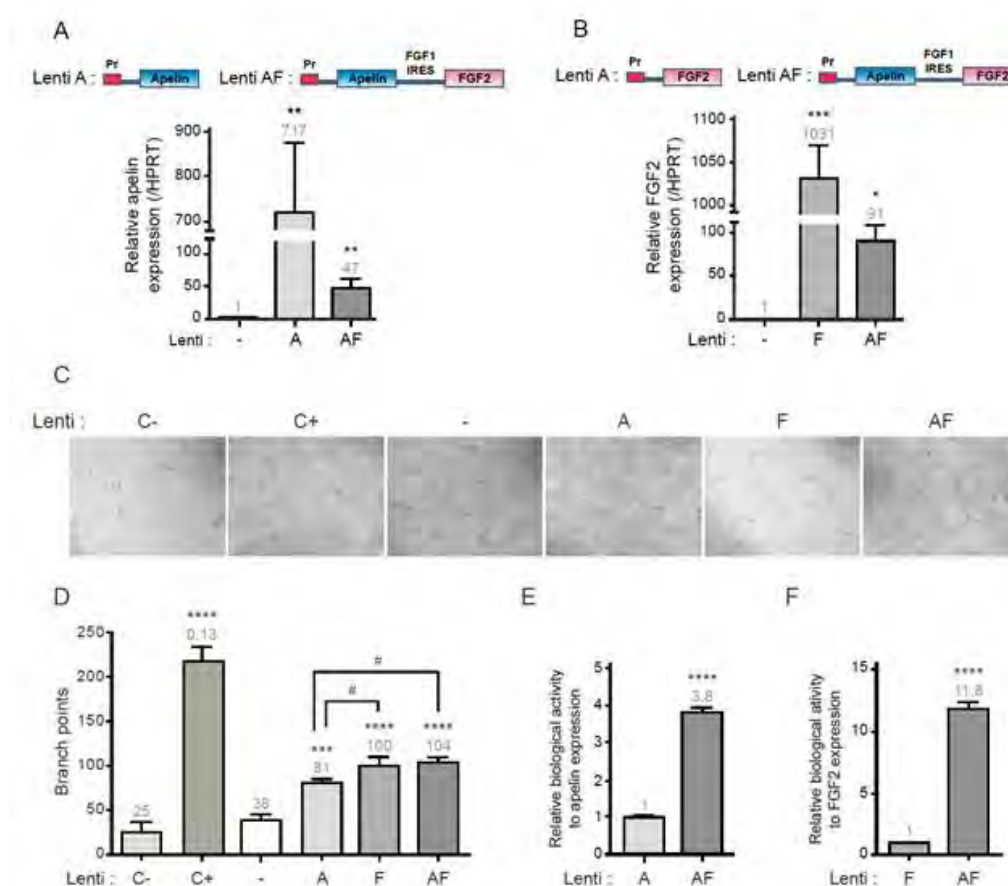


Figure 2. Stimulation of HUVEC tubulogenesis by transduced HL-1 cell conditioned media.

A-B. HL-1 cardiomyocytes were transduced by monocistronic and bicistronic lentivectors carrying apelin and/or FGF2 cDNA (see schemas). Transgene expression was measured by RT qPCR from HL-1 total RNAs 48h after transduction using primer couples targeting apelin (A) or FGF2 (B). For each transduction, the name of the transgene is indicated. A, F or AF means the monocistronic cassette apelin or FGF2, or the bicistronic cassette apelin-IRES-FGF2, respectively. Quantifications are represented as mean \pm standard error of the mean, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

C-F. To determine the angiogenic potential of the lentivectors carrying apelin, FGF2 or apelin-FGF2 expression cassette, conditioned media of transduced HL-1 cells were used in a tubulogenesis assay. To assess the ability of HUVECs to form vessel-like structures in culture, they were plated on Matrigel in the presence of conditioned medium from transduced HL-1 cells, as described in Mat & Meth. The positive control (C+) corresponds to medium with 2.5% serum. Negative controls correspond to medium with 0.25% serum (C-) or to conditioned media from non-transduced HL-1 cells (-). Conditioned media of HL-1 transduced by lentivector apelin, FGF2 or apelin-FGF2 are indicated by A, F and AF, respectively. Cultures were photographed (C) and the mean number of branch points was determined (D). Branch points were normalized by apelin (E) and FGF2 (F) mRNA amounts to determine the biological activities of conditioned media. Studies were performed in triplicates. Histograms correspond to means \pm standard error of the mean, **** $p < 0.0001$ compared to "-"; # $p < 0.05$ compared to apelin.

HL-1 conditioned media were assessed in a tubulogenesis experiment *in vitro* on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Branch points were quantified, showing as expected that both apelin and FGF2 are angiogenic *in vitro*, with a stronger efficiency of FGF2. Interestingly, combination of apelin and FGF2, despite their very low expression from the bicistronic lentivector, stimulated tubulogenesis more efficiently than apelin alone and as efficiently as FGF2 alone expressed in huge amounts from the monocistronic vectors (Fig. 2C and 2D). When expressed relatively to transgene (apelin, FGF2 or apelin-FGF2) mRNA amount, the biological activities of conditioned media revealed that association of apelin and FGF2 is 4 and 11.5 times more efficient in stimulating angiogenesis *in vitro*, than FGF2 or apelin alone, respectively (Fig. 2E and 2F). This suggests a cooperative effect of FGF2 and apelin.

Combination of apelin and FGF2 efficiently stimulates angiogenesis in mouse ischemic heart.

The bicistronic lentivector apelin-FGF2, as well as the monocistronic lentivector apelin and the bicistronic luciferase lentivector (Fig. 3A) were then injected into infarcted myocardium according to the protocol described above (Fig. 1A). RT qPCR analysis showed that all lentivectors allowed transgene expression in heart (Fig. 3A, Table S1, PTRIP3'). Apelin expression was detected by immunohistofluorescence in cardiac tissue, revealing an increased expression compared to non-transduced heart with both monocistronic and bicistronic lentivectors (Fig. 3B and 3C). To identify the effect of apelin or apelin-FGF2 treatment on blood vasculature, angiogenesis was measured by immunohistofluorescence using an anti-CD31 antibody, in heart ischemic area 7 weeks after infarction (Fig. 3D and 3E). Data revealed that apelin alone is not able to stimulate angiogenesis *in vivo* whereas combination of apelin and FGF2 generates a significant increase of angiogenesis as observed *in vitro*.

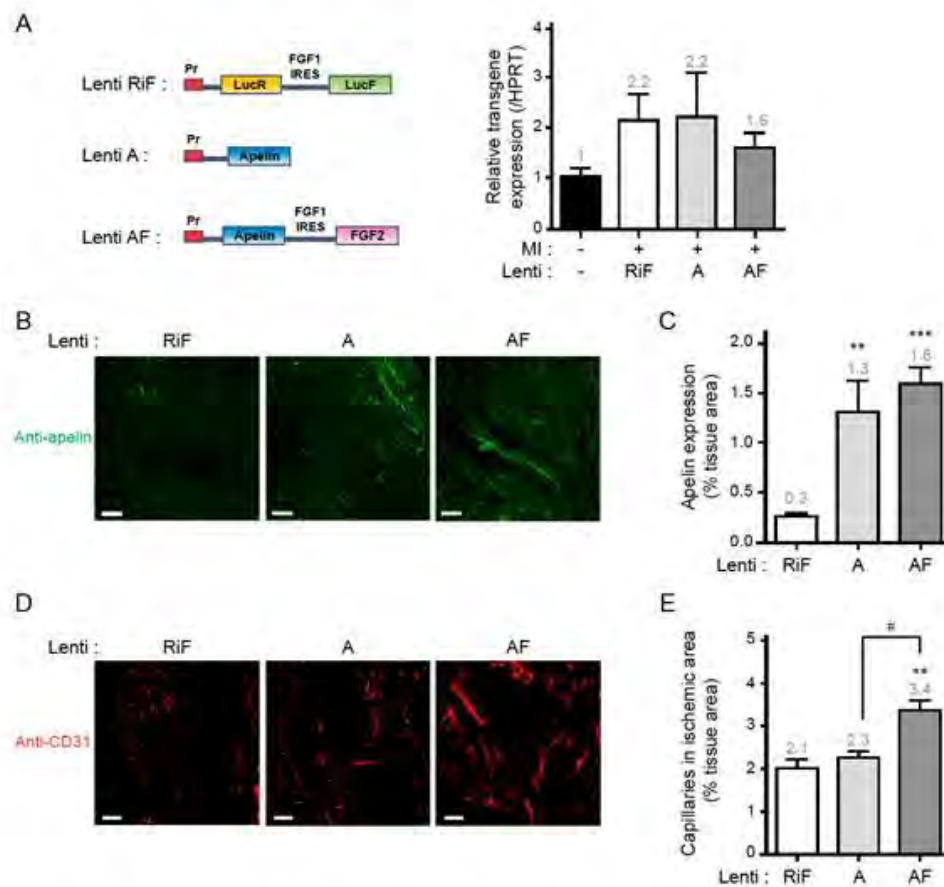


Figure 3. Stimulation of angiogenesis by therapeutic lentivectors in mouse ischemic heart.

A. Mono- and bicistronic lentivectors carrying apelin or apelin-FGF2 expression cassettes, as well as the control lentivector RiF, were injected into ischemic heart according to the protocol described in Figure 1A. Transgene expression was measured by RT qPCR from HL-1 total RNAs 48h after transduction, using a primer couple targeting the transgene mRNA 3' region common to all constructs.

B-C. Tissue sections were immunostained 7 weeks after lentivector injection with anti-apelin antibody to check transgene expression (B). Apelin quantification is shown by histograms (C). D-E. Capillary density was analyzed with anti-CD31 antibody in ischemic areas after treatment with mono or bicistronic lentivector (D). CD31 quantification is shown by histograms (E). Quantification is expressed as a percentage of the analyzed tissue area in the infarcted region (mean \pm standard error of the mean, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to 'RiF' and # $p < 0.05$, compared to 'A'; $n = 3-6$ mice per group). Presence or absence of myocardial infarction (MI) is indicated by "+" or "-". Treatment with lentivector control, apelin or apelin-FGF2 is indicated by RiF, A and AF, respectively. The scale is indicated by a bar corresponding to 50 μ m.

The triplet apelin-FGF2-SERCA2a significantly improves cardiac function.

In an attempt to complete the apelin-FGF2 combination by a therapeutic molecule able to improve heart contractile function, we added the SERCA2a cDNA as a third therapeutic gene in the lentivector, under the control of a second copy of the FGF1 IRES (Fig. 4A). SERCA2a expression from the lentivector was checked in HL-1 cells by immunocytofluorescence (Fig. 4B). Expression of the lentivector *in vivo* was confirmed by RT qPCR (Table S1, PTRIP3'). This

tricistronic lentivector was first assessed to compare its angiogenic properties to the lentivector expressing apelin-FGF2. As expected (SERCA2a is not angiogenic), the tricistronic lentivector stimulated angiogenesis in infarcted myocardium as efficiently as the bicistronic lentivector apelin-FGF2 (Fig. 4C).

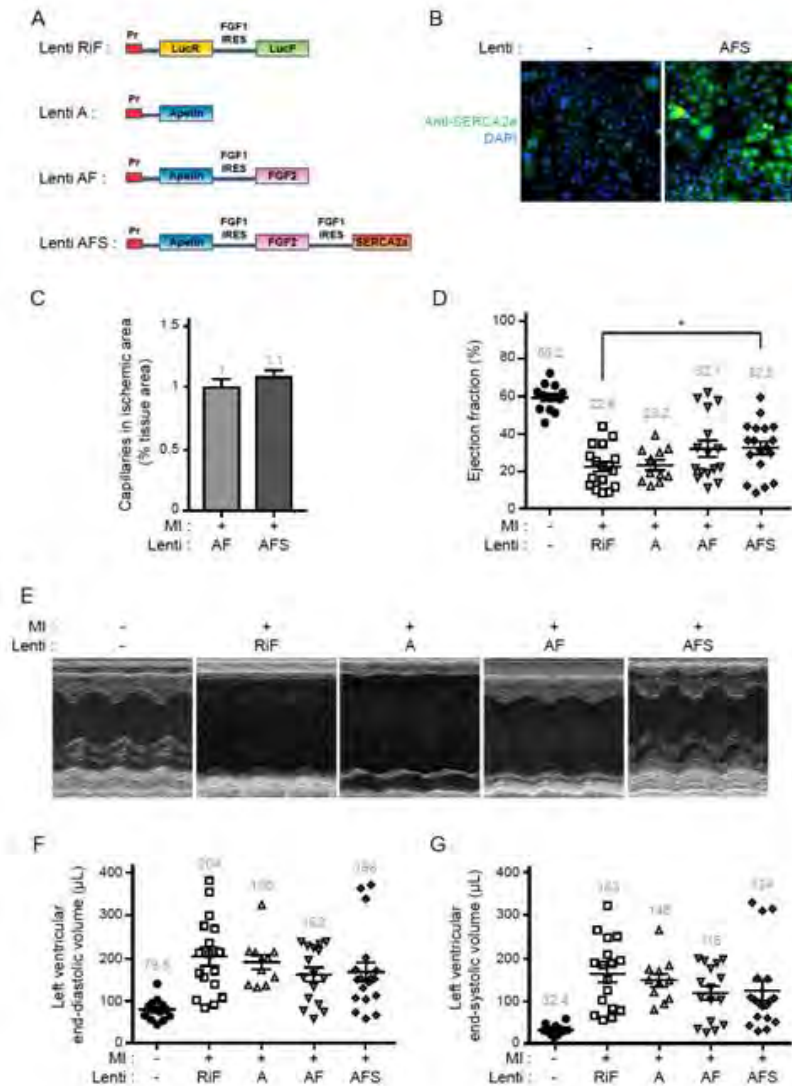


Figure 4. Improvement of heart echocardiography parameters following treatment by therapeutic lentivectors.

A. Lentivectors carrying apelin, or apelin-FGF2, or apelin-FGF2-SERCA2a expression cassettes, as well as the control lentivector RiF are represented.

B. Expression of SERCA2a (green) from the tricistronic lentivector (AFS) was detected after HL-1 cell transduction using anti-SERCA2a antibody.

C. The four lentivectors were injected into ischemic heart according to the protocol described in Figure 1A. Capillary density was measured for AFS and AF lentivectors as in Figure 3E to check that these two vectors have the same angiogenic properties.

D-G. Echocardiography was performed 7 weeks after lentivector injection. Ejection fraction (D), representative echocardiograms (E) and left ventricular dilation (F and G) are shown (mean \pm standard error of the mean, * $p < 0.05$, $n = 11-18$ mice per group). Presence or absence of myocardial infarction (MI) is indicated by "+" or "-". Treatment with lentivector control, apelin, apelin-FGF2 or apelin-FGF2-SERCA2a are indicated by RiF, A, AF and AFS respectively.

Echocardiographic assessment of left ventricular function in ischemic heart 7 weeks after treatment with the mono-, bi- or tricistronic lentivectors apelin, apelin-FGF2, or apelin-FGF2-SERCA2a, revealed a significant increase of the ejection fraction with the triplet apelin-FGF2-SERCA2a (32.5%) compared to the control (22.6%), whereas apelin alone was not able to improve this parameter (23.2%) (Fig. 4D and 4E). Interestingly, the ejection fraction increased to 32.1% with the lentivector apelin-FGF2, suggesting a therapeutic benefit due to association of apelin with FGF2, even in the absence of SERCA2a. These data were confirmed by the values of left ventricle dilation. The end-diastolic volume decreased from 204 to 168 μ L and the end-systolic volume from 163 to 124 μ L, respectively, following treatment with the apelin-FGF2-SERCA2a triplet (Fig. 4F and 4G). However, this therapeutic benefit was not superior to that obtained with apelin-FGF2 combination.

These data suggested that the combination of apelin, FGF2 and SERCA2a seems to be the most efficient treatment to restore left ventricle function of ischemic heart, although not significantly better than the doublet apelin-FGF2 for these parameters.

The triplet apelin-FGF2-SERCA2a decreases cardiac hypertrophy and fibrosis.

To further demonstrate the therapeutic benefit of the lentivectors apelin, apelin-FGF2 and apelin-FGF2-SERCA2a, we analyzed their ability to prevent heart muscle remodeling compared to the control luciferase lentivector. As shown in Figure 5A, treatment with apelin alone is able to decrease the ratio of heart weight to mouse weight from 9.1 to 6.5. Combined treatment with apelin-FGF2 or apelin-FGF2-SERCA2a is more efficient with a ratio of 5.4 and 5.3, respectively. In addition, treatment with the three therapeutic vectors decreases cardiomyocyte area (Fig. 5B and 5C). The benefit of adding SERCA2a in the combination treatment clearly appears here, as the apelin-FGF2-SERCA2a vector is the most efficient, with a significant decrease of myocyte area from 508 to 444 μ m², whereas this area remains higher (491 μ m²) with the apelin-FGF2 vector.

Fibrosis was then measured by Sirius Red staining. Treatment with the three therapeutic lentivectors prevented fibrosis expansion (Fig. 5D and 5E). Here again, the most significant effect on fibrosis was observed with the triplet apelin-FGF2-SERCA2a, with a decrease from 7.8% to 3.2%, whereas fibrosis values were 5.4% and 4.1% with apelin and apelin-FGF2, respectively.

Altogether, these data showed that the triplet apelin-FGF2-SERCA2a provides the best therapeutic benefit in preventing adverse ventricular remodeling.

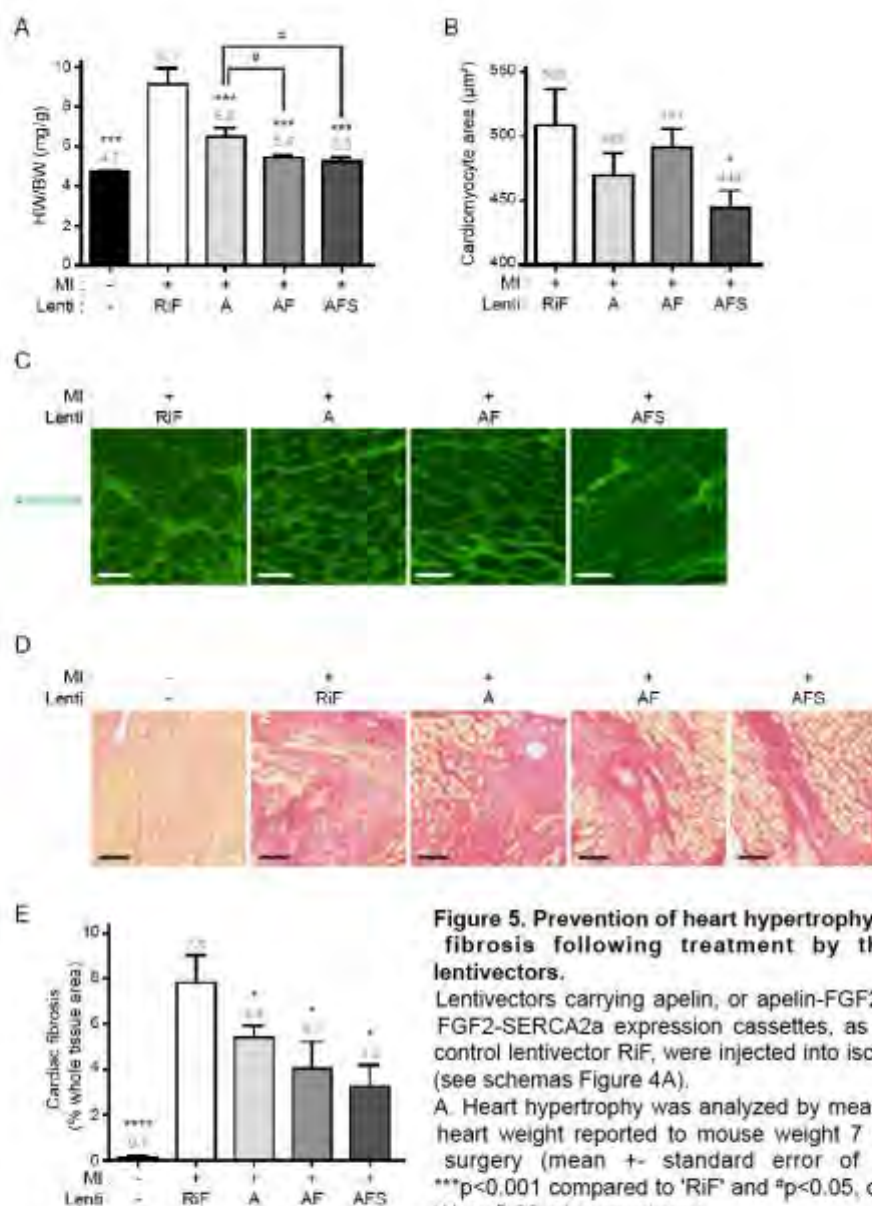


Figure 5. Prevention of heart hypertrophy and fibrosis following treatment by therapeutic lentivectors.

Lentivectors carrying apelin, or apelin-FGF2, or apelin-FGF2-SERCA2a expression cassettes, as well as the control lentivector RiF, were injected into ischemic heart (see schemas Figure 4A).

A. Heart hypertrophy was analyzed by measurement of heart weight reported to mouse weight 7 weeks after surgery (mean \pm standard error of the mean, *** p <0.001 compared to 'RiF' and * p <0.05, compared to 'A', n =5-23 mice per group).

B-C. Cardiomyocyte hypertrophy was analyzed by measurement of cardiomyocyte area into septum region using wheat germ agglutinin (WGA) staining of tissue sections (mean \pm standard error of the mean, * p <0.05 compared to 'RiF', n =3-4 mice per group) (B). Representative pictures are shown (C). The scale is indicated by a bar corresponding to 50 μ m.

D-E. Fibrosis was analyzed by Sirius Red staining of tissue sections (D). The scale is indicated by a bar corresponding to 100 μ m. Collagen deposition areas were quantified at three different levels of the heart (E) and are expressed as a mean percentage of the whole tissue area (mean \pm standard error of the mean, * p <0.05; n =3-6 mice per group). Presence or absence of myocardial infarction (MI) is indicated by "+" or "-". Treatment with lentivector control, apelin, apelin-FGF2 or apelin-FGF2-SERCA2a are indicated by RiF, A, AF and AFS respectively.

Ischemia strongly modifies the profile of gene expression in heart.

Gene expression was analyzed in ischemic heart in order to determine, first, the impact of ischemia on expression of genes related to angiogenesis, cardiac function, extracellular

matrix, inflammation, stress and signaling. This was performed using the Fluidigm DELTAgene AssayTM, a PCR array on a 96 gene chip dedicated to genes mentioned above (see Mat & Meth and Table S2). The assay was achieved on cDNAs from normal and ischemic hearts, treated or not with the different lentivectors (Table S1, Fig. 6 and Fig. S1). As regards genes related to angiogenesis, we observed a moderate to strong increase of about half of the angiogenic genes whereas the other half was down-regulated in ischemic heart, in the absence of therapeutic lentivector treatment (Fig. 6A, white boxes). The most strikingly up-regulated gene was connective tissue growth factor (CTGF). Several anti-angiogenic genes were also strongly up-regulated, including thrombospondin-1 (THBS1) and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1), showing a strong impact of ischemia on the angiogenic balance (Fig. 6B, white boxes). Five markers of cardiac remodeling and heart dysfunction were up-regulated, including atrial natriuretic peptide (ANP), B-type natriuretic peptide (BNP) and beta-myosin heavy chain (β -myHC)(Fig. 6C, white boxes). Also, data show strong up-regulation of fibrosis markers such as fibronectin 1 (FN1), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and collagens 1 and 3 (Col1a1, Col3a1), while the matrix metalloproteinases were also up-regulated (Fig. 6D, white boxes). Stress-related genes were induced (Fig. S1A). As regards inflammation and signaling genes, the most important increases were observed for interleukin 6 (IL6) and transforming growth factor alpha (TGFA), respectively (Fig. S1B and S1C).

Treatment by the triplet apelin-FGF2-SERCA2a restores the angiogenic balance and cardiac function genes.

Given the beneficial impact of treatment with therapeutic lentivectors, we were interested in analyzing the effect of such treatment on gene expression. Thus cDNAs from ischemic hearts treated with lentivector apelin, apelin-FGF2 or apelin-FGF2-SERCA2a were analyzed in the Fluidigm chip described above, in comparison to the control (Fig. 6, Table S1). The data clearly showed little effect of apelin alone on gene expression, in concordance with the weak therapeutic effect of the treatment (Fig. 6, Fig. S1, light grey boxes). In contrast, treatment with apelin-FGF2 or with apelin-FGF2-SERCA2a had a strong impact on gene expression (Fig. 6, Fig. S1, dark grey and black boxes). In several cases, gene expression deregulation was almost restored at the level of non ischemic heart, in particular with the tricistronic lentivector. This was visible for several angiogenic genes which were up-regulated in ischemic heart, especially CTGF and hepatocyte growth factor (HGF), but also for anti-angiogenic genes such as THBS1 and PAI1, as well as for cardiac remodeling (ANP, β -myHC, BNP) and fibrosis markers (FN1, TIMP1, MMPs...)(Fig. 6). This recovery of gene expression was also observed for stress-related genes and various signaling genes (TGFA, TGFB2...)

whereas no significant effect was observed on the inflammation genes tested in our study (Fig. S1). In most cases, gene expression recovery was superior with apelin-FGF2-SERCA2a than with apelin-FGF2.

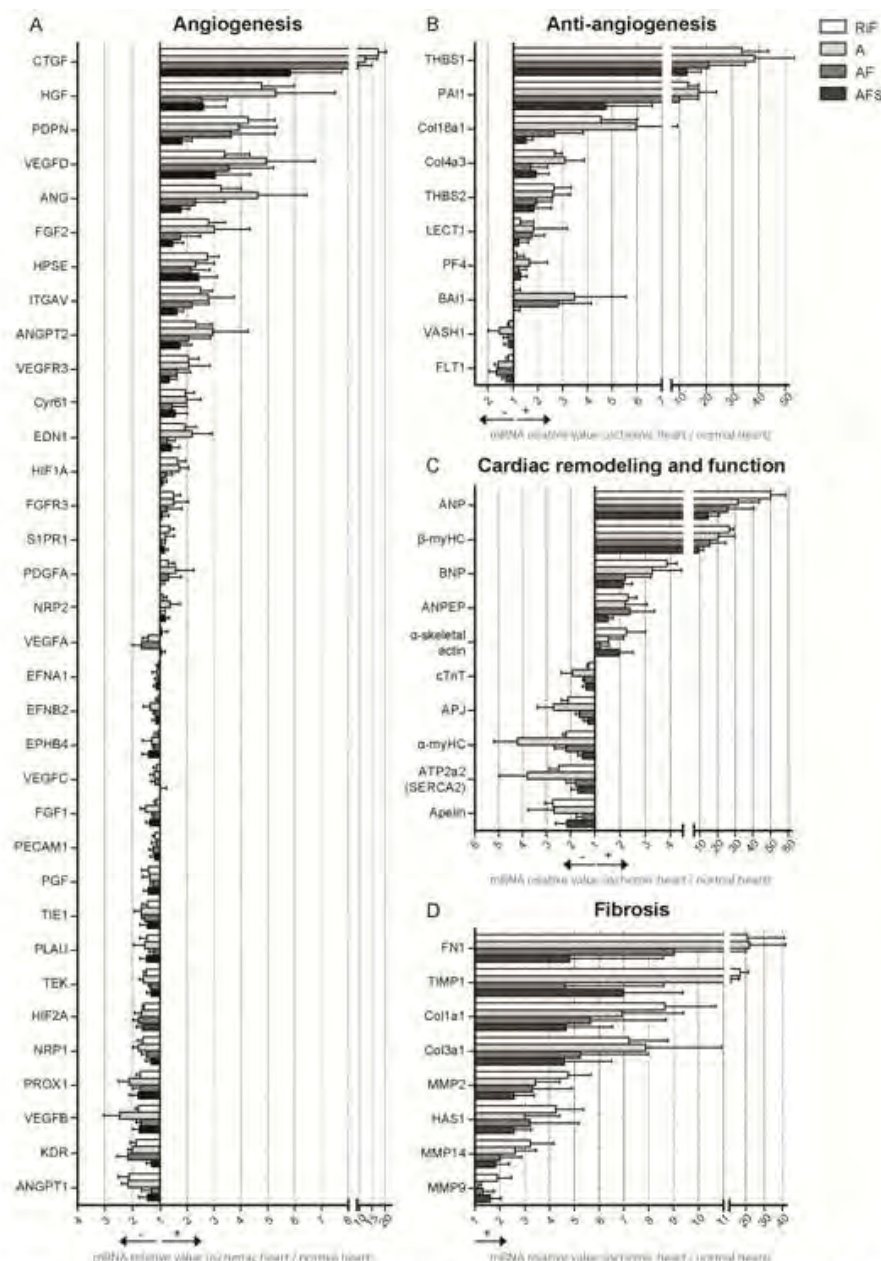


Figure 6. Effect of the treatment with therapeutic vectors on the transcriptome in ischemic heart.

A-D. Total RNA was purified from ischemic areas after 7 weeks of therapeutic vectors treatment. cDNA was synthesized and used for a Fluidigm DELTA Gene Assay™ which is a PCR array dedicated to genes related to angiogenesis (A), anti-angiogenesis (B), cardiac remodeling and function (C) fibrosis (D), stress, inflammation or signaling (Fig. S1, Table S1). Messenger RNA levels are presented by histograms for treatment with lentivector control (RiF, white boxes), apelin (A, light grey boxes), apelin-FGF2 (AF, dark grey boxes) or apelin-FGF2-SERCA2a (AFS, black boxes) as the fold-change of repression (on the left of the axis) or induction (on the right of the axis) normalized to the group without myocardial infarction (mean \pm standard error of the mean, $n=3-6$ mice per group). The detailed values are presented in Table S1.

These data clearly show that the therapeutic benefits generated by the apelin-FGF2 and apelin-FGF2-SERCA2a lentivectors are related to gene expression restoration towards the levels of non ischemic hearts. In particular, the treatment works towards recovery of the angiogenic balance and expression of genes involved in cardiac remodeling and function, extracellular matrix and signaling genes. These results demonstrate the added value of the combined treatments. Furthermore they also show that the triplet apelin-FGF2-SERCA2a has the strongest impact on gene expression recovery.

DISCUSSION

In a context where gene therapy has a strong potential for the treatment of cardiac diseases, the present study provides new perspectives in the field. Indeed, we show that combined gene transfer of apelin, FGF2 and SERCA2a in a mouse model of ischemic heart disease provides a significant therapeutic benefit. Furthermore our data reveal that such treatment strongly impacts on the transcriptome by restoring the angiogenic balance as well as expression of genes involved in cardiac function and remodeling.

The first point that could be questioned in this study is the choice of lentivector for gene transfer whereas plasmid, adenoviral vector and AAV are commonly used for gene therapy of ischemic heart disease in both preclinical and clinical assays. Self-inactivating lentivector has been selected here because of its safety and ability to drive long-term transgene expression in heart (31, 36). In their report, Niwano and colleagues showed the therapeutic benefit of a lentivector expressing SERCA2a to treat heart failure in rats. Another study also successfully used lentivectors to reprogram *in situ* cardiac fibroblasts into cardiomyocytes by gene transfer of a cocktail of transcription factors (37). Furthermore, a recent report compared efficacy and safety of myocardial gene transfer using different viral vectors in mouse (38). Although gene transduction efficacy by lentivector was lower than that observed with other vectors (25% of adenoviral vector, 50% of AAV2 or AAV9), these authors clearly showed that both AAVs and lentivector are safer than adenovirus vector because they generate significantly lower tissue inflammation. Merentie *and colleagues* also encourage to further study the potential of lentivectors in cardiac gene therapy, knowing the recent problems encountered with the CUPID-2 clinical trial using an AAV1 expressing SERCA2a (11). The most probable reason of the lack of success of this approach could be inefficient gene delivery due to intracoronary injection, as other routes of administration (intramyocardial injection or retrograde injection via the coronary sinus) are reported as more efficient (39). In addition, a notable drawback in the use of AAV is the presence of

neutralizing antibodies in human that prevents gene transduction. The prevalence of such antibodies poses a dilemma because more than half of gene therapy candidates are not eligible in clinical trials on the basis of their antibody titer, whereas the eligible candidates develop antibodies against the vector, which exclude the possibility of subsequent reinjection of the therapeutic agent (8). In such a context, our study validates the use of lentivectors for gene therapy of heart failure.

Combined gene therapy has appeared to be a promising therapeutic strategy, with applications to many diseases (12, 40). IRES-based vectors constitute the most frequent tool used to co-express several genes of interest, while alternative approaches using 2A peptides have emerged (41). A few clinical trials of gene therapy have successfully used multicistronic IRES-based viral vectors. A clinical trial of phase I/II was performed by intracerebral injection of a bicistronic IRES-based recombinant AAV vector on patients with mucopolysaccharidosis type IIIA (42). On the same year, a phase I/II assay was achieved with Parkinson's disease patients using a tricistronic IRES-based lentivector administrated by intrastriatal delivery, generating significant improvement of motor scores in all patients at 6 months (43). This first-in-man use of a lentiviral-based gene therapy vector has clearly opened the perspective of using lentivectors for gene therapy in future clinical assays. In the field of heart ischemia, the only IRES-based vector tested in a clinical study has been a plasmid expressing VEGF and FGF2, which generated a moderate therapeutic effect (18). This limited effect may result from low and transient gene transfer efficiency obtained with plasmids, or from the choice of the therapeutic molecule combination. Another reason of this poor efficiency might also be due to the choice of the encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES, present in most IRES-based vectors published up to now. Indeed, the EMCV IRES is not activated in ischemic tissues, in contrast to IRESs from angiogenic factor mRNAs (19, 21, 44). The FGF1 IRES was selected in the present study because we have previously shown its efficacy to drive expression of angiogenic factors in ischemic mouse leg (17). Here we show that the FGF1 IRES allows more efficient transgene expression in ischemic than in non ischemic heart. Its sensitivity to hypoxia was confirmed in cardiomyocytes *in vitro* (Hantelys and colleagues, unpublished data). These results suggest that the FGF1 IRES constitutes a more adequate tool than the EMCV IRES, to drive gene transfer into ischemic tissues.

Among the three therapeutic candidates selected for combined gene therapy in this report, FGF2 and SERCA2a have been assessed several times (but never combined) in pre-clinical and clinical trials of ischemic heart failure, giving nuanced results (5, 8, 11). In contrast, apelin is an emerging candidate in the field of gene therapy of ischemic heart failure: it has been used only by one group as a therapeutic gene in mouse models of heart disease (28,

30). In the report by Li and colleagues, treatment with apelin-overexpressing bone marrow cells has been shown to improve cardiac repair after mouse myocardial infarction, whereas Zeng and colleagues have reported that an adenovirus-apelin injected into diabetic *db/db* mice increases myocardial vascular density and ameliorates diabetic cardiomyopathy (28, 30). Apelin acts at different levels to improve heart function. Apelin gene-deficient mice exhibit impaired heart contractility, whereas administration of recombinant apelin restores SERCA2a expression in high-fat fed mice (26, 45). Apelin is cardioprotective by preventing the nuclear translocation of the transcription factor FoxO3, a regulator of genes involved in apoptosis, survival and oxidative stress (25). Apelin has also been reported to upregulate histone deacetylase Sirtuin 3, that plays a crucial role in the regulation of mitochondria ROS formation in aging-related cardiac hypertrophy (28). Furthermore, apelin stimulates angiogenesis in ischemic heart by activating VEGF/VEGFR2 and Ang-1/Tie-2 signaling pathways (30). In our animal model, gene therapy with apelin alone clearly improves heart hypertrophy and fibrosis but has little effect on amelioration of echocardiography parameters and angiogenesis, although it is angiogenic *in vitro*. Such nuanced effects of apelin gene therapy in our conditions may result from both insufficient efficiency of gene transfer and induction of endogenous apelin in ischemic heart which may mask the effect of exogenous apelin (46).

In contrast to the moderate effect of treatment by the monocistronic lentivector apelin observed here, the bicistronic and tricistronic lentivectors apelin-FGF2 and apelin-FGF2-SERCA2a improve all the parameters tested in our study, including ejection fraction, left ventricle dilation, hypertrophy, fibrosis and angiogenesis. Addition of SERCA2a to the pair apelin-FGF2 increases the therapeutic benefit. However the most striking effect is the cooperation of apelin with FGF2 despite the lower expression of the bicistronic compared to the monocistronic vectors. This observation is in accordance with our previous studies using combinations of angiogenic factors FGF2 and Cyr61, or of anti-angiogenic factors fibroblast growth factor inhibition and endostatin to treat leg ischemia or cancer, respectively (17, 35). The present data confirm that multicistronic vectors generate more efficient gene therapy with lower doses of therapeutic molecules, a very interesting feature that diminishes the risk of side effects (17). A few previous studies have shown that heart left ventricle pathology is related to regulation of gene networks (47, 48). The present study, in agreement with these previous reports, shows an important regulation of gene networks involved in cardiac remodeling and extracellular matrix in ischemic heart. Furthermore, in contrast to previous ones, our analysis is mainly focused on angiogenesis-related genes and demonstrates a strong regulation of the angiogenesis gene network, corresponding to a drastic change of the angiogenic balance. Also, our data reveal that treatment of ischemic heart with the

therapeutic lentivectors strongly impacts gene regulation by restoring the control of gene expression close to the levels observed in normal heart. Combination of therapeutic genes is more efficient in this restoration of angiogenic balance as well as heart remodeling and function genes. In particular, the triplet apelin-FGF2-SERCA2a shows the best efficiency in such gene regulation recovery. Combining several therapeutic genes thus appears as a promising approach to restore the regulation of gene networks. This result also provides a hypothesis of mechanism for the cooperative effect of therapeutic molecules in ischemic heart treatment.

MATERIALS & METHODS

Lentivector construction and production

Lentivectors carrying the murin apelin precursor gene, 234-bp cDNA, the human FGF2 gene, and/or the human SERCA2a gene were constructed, as well as lentivector carrying the *renilla* luciferase and/or the stabilized firefly luciferase Luc+. The expression cassettes were inserted into the SIN lentivector pTRIP-DU3-CMV-MCS vector described previously (35). All cassettes are under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter; the second and the third cistrons are separated from the previous one by the human FGF1 IRES A sequence (49). Lentivector particles were produced using the tri-transfection procedure with the plasmids pLvPack and pLvSVg, CaCl₂ and Hepes Buffered Saline (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), into HEK-293FT cells. Viral supernatants were harvested 48 hours after transfection, passed through 0.45-μm PVDF filters (Dominique Dutscher SAS, Brumath, France) and treated by DNase I recombinant (Roche Diagnostics, Meylan, France) with MgCl₂ (Sigma-Aldrich). Lentivectors were concentrated over 1000-fold through a single step ultracentrifugation at 24000rpm at 4°C for 1h30. The viral pellet was resuspended in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with Mg²⁺ and Ca²⁺ (Sigma-Aldrich). Viral stocks were stored in aliquots at -80°C until use. Viral production titers were determined by ELISA assay (Innotest HIV p24 INGEN SA, Rungis, France). Functional viral titers were assessed on HT1080 cells with serial dilutions and scored for GFP expression by flow cytometry analysis on a BD FACSVerse (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

Cell culture and transduction

HEK-293FT cells and HT1080 cells were cultured in DMEM-GlutaMAX + Pyruvate (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), and MEM essential and non-essential amino acids (Sigma-Aldrich).

HL-1 cells were a kind gift from Dr. William Claycomb (Department of Biochemistry & Molecular Biology, School of Medicine, New Orleans) (50). HL-1 cells were cultured in Claycomb medium containing 10% FBS, Penicillin/Streptomycin (100U/mL-100µg/mL), 0.1mM norepinephrine, and 2mM L-Glutamine. Cell culture flasks were pre-coated with a solution of 0.5% fibronectin and 0.02% gelatin 1h at 37°C (Sigma-Aldrich).

HUVEC cells (Promocell, C-12203, Heidelberg, Germany) were grown in Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, C-22010).

For transduction, 6.10^4 HL-1 cells were plated into each well of a 6-well plate and transduced overnight in 1 mL of transduction medium (OptiMEM-GlutaMAX, Life Technologies SAS) containing 5 µg/mL protamine sulfate in the presence of lentivectors (MOI 2). GFP-positive cells were quantified by flow cytometry analysis on a BD FACSVerse (BD Biosciences). HL-1 cells were transduced at 80%.

Endothelial cell tubulogenesis

After HL-1 transduction by lentivectors, medium was changed and cells were maintained 24h in OptiMEM-GlutaMAX (Life Technologies SAS). Conditioned media were collected and stored at -80°C until being used.

4.10^4 HUVEC cells were seeded in wells of a 48-well plate containing 300 µL Matrigel Growth Factor Reduced (Corning BV, Amsterdam, Netherlands), in presence of 250 µL HL-1 cells conditioned media and 250 µL Endothelial Cell Growth Medium at 0.5% serum. Cells were incubated at 37°C for 8h. The number of vessel branch points was determined for triplicate samples.

Reporter activity assay

For reporter lentivectors, luciferase activities *in vitro* and *in vivo* were performed using Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Briefly, proteins from HL-1 cells were extracted with Passive Lysis Buffer (Promega France) and proteins from mice heart using PLB and a Precellys® homogenizer (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Quantification of bioluminescence was performed with a luminometer (Centro LB960, Berthold, Thoiry, France).

Ischemic heart mouse model and gene transfer

Animal experiments were conducted in accordance with the recommendations of the "European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes". All animal experiments were performed according to the INSERM IACUC guidelines for laboratory animals' husbandry and have been approved by the "Comité

d'Ethique de la Chambre Professionnelle du Conseil Régional Midi-Pyrénées" (protocol No MP/13/27/03/12). Experiments were performed on 10- to 12-week-old male C57BL/6J mice (Janvier, Genest-Saint-Isle, France). Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine-xylazine (63 mg/kg - 2.5 mg/kg) followed by an inhalational anesthesia with isoflurane (2%) for maintenance. Mice were endotracheally intubated. The thorax was shaved and a left-thoracotomy was performed to expose the heart through the fourth intercostal space. The left anterior descending coronary artery was ligated and lentivectors were injected at the border between the ischemic area and the healthy area of the myocardium ($2-2.5 \times 10^6$ TU in 10 μ L). The thorax was then closed with separate points using a 6.0 nylon monofilament (Ethnor, Auneau, France), followed by skin surface suture. Then, isoflurane was stopped and a subcutaneous injection of buprenorphine (Buprecare 100 μ g/kg) was performed. Mice remained air ventilated until the return of peripheral reflexes. Sham-operated mice were prepared in the same manner but did not undergo coronary artery ligation and lentivector injection. Mice were sacrificed 1 or 7 weeks after surgery.

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed to evaluate the left ventricular systolic function in the sham-operated and operated groups using the VEVO 2100 system (VisualSonics, Toronto, ON, Canada)(Fig. 1A). Animals were anesthetized with inhaled isoflurane (2%) vaporized in medical O₂. The thoracic hair was removed with a depilatory cream and the mice were then placed on a heating pad. Their rectal temperature was maintained between 36°C and 37°C during the examination. The paws were connected to an ECG and an ultrasound gel was placed to form an interface between the chest and the transducer. Echocardiographic measurements were obtained from the parasternal long axis view from B-mode images and from the parasternal short axis view from M- and B-mode images at three different levels. Simpson measurements of the left ventricle included heart volume in systole and diastole and ejection fraction.

RNA purification and RT-qPCR

Total RNA extraction from HL-1 cells or from heart ischemic areas was performed using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Life Technologies SAS). RNA quality and quantification were assessed by a Xpose spectrophotometer (Trinean, Gentbrugge, Belgium) and an automated electrophoresis system (Fragment Analyzer, Advanced Analytical Technologies, Paris, France).

500 ng RNA was used to synthesize cDNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France).

Gene expression was investigated using SsoFast Eva Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and performed on a StepOne sequence detection system (Applied Biosystems). The oligonucleotide primers used were: HPRT (5'-TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC-3' and 5'-GGACGCAGCAACTGACATTTTC-3'), 3'-end sequence of lentivector cassettes (5'-AACATGGAGCAATCACAA-3' and 5'-GCCTTGTAAGTCATTGGT-3'), apelin (5'-GTTTGTGGAGTGCCACTG-3' and 5'-CGAAGTTCTGGGCTTCAC-3') and FGF2 (5'-TGGTATGTGGCACTGAAACGA-3' and 5'-GCCCAGGTCCTGTTTTGGAT-3'). Each reaction was run with HPRT as a reference gene and all data were normalized based on HPRT expression levels. Melting curve analysis was performed to ensure a single PCR product and a specific amplification. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Fluidigm DELTAgene Assay™

The DELTAgene Assay™ was designed by Fluidigm Corporation (San Francisco, USA). The qPCR-array was performed on BioMark with the Fluidigm 96.96 Dynamic Array following the manufacturer's protocol (Real-Time PCR Analysis User Guide PN 68000088). The list of primers is provided in Table S2. A total of 5ng of cDNA was pre amplified using PreAmp Master Mix (Fluidigm, PN 100-5580, 100-5581, San Francisco, USA) in the plate thermal cycler at 95°C for 2 min, 10 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 4 min. The preamplified cDNA was treated by endonuclease I (New England BioLabs, PN M0293L, Massachusetts, USA) to remove unincorporated primers.

The preamplified cDNA was mixed with 2x SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad, PN 172-5211, California, USA), 50 μ M of mixed forward and reverse primers and sample Loading Reagent (Fluidigm, San Francisco, USA). The sample was loaded into the Dynamic Array 96.96 chip (Fluidigm San Francisco, USA). The qPCR reactions were performed in the BioMark PCR system. Data was analyzed using the BioMark PCR Analysis Software Version 2.0. mRNA levels were calculated as the fold-change of repression or induction normalized to the group without myocardial infarction.

Western immunoblotting

HL-1 were harvested in lysis buffer (50 mM Tris-HCL pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 20 μ L protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics) and clarified by centrifugation at 13000 rpm for 10 min at 4°C. Proteins supernatant were quantified using the Bradford method (Biorad). 30 or 10 μ g of protein per sample was separated on a 4-20% polyacrylamide gel (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) and electroblotted on nitrocellulose membranes. Western immunoblotting was performed using 1:400 rabbit

polyclonal anti-FGF2 (Santa Cruz, FGF-2 (147): sc-79) and 1:3000 mouse monoclonal β -actin (Sigma-Aldrich, A2228: AC-74).

Immunohistology

Hearts were excised, immediately embedded into OCT compound and stored at -80°C. 10 μ m tissue sections were immunostained with CD31 (1:200, 553370, BD Biosciences), Firefly luciferase (1:25, G7454, Promega), apelin (51) and SERCA2a (1:100, MA3-919, Thermo Fischer Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) antibodies. Capillary density was quantified in the damage area in 6-12 microscopic fields per cryosection by automated pixel density determination of the CD31+ area using the non-commercial image processing software ImageJ (<http://imagej.nih.gov.gate2.inist.fr/ij/>). Results are expressed as a percentage of the analyzed tissue area. Nuclei were visualized with DAPI (1:1000, 32670, Sigma Aldrich) (not shown).

Oregon green® 488 conjugated wheat germ agglutinin (1:500, W6748, Life technologies SAS) was used to quantify cardiomyocytes area in septum region. Measurements were performed in transversal heart cryosections by manually tracing the cell contour on whole heart images acquired on digital slide scanner NanoZoomer using NDP.view2 Viewing software (Hamamatsu).

Sirius Red staining was performed according to standard procedure, at three different levels of the heart. Fibrosis was quantified by measuring the area of collagen deposition on whole slide images acquired on digital slide scanner NanoZoomer (Hamamatsu) using ImageJ software and is expressed in mean percentage of the whole tissue cryosection.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using a two-tailed Student's t-test or one-way ANOVA and are expressed as mean \pm standard error of the mean, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks go to Y. Barreira, C. Pestourie and S. Le Gonidec from the Inserm US006 platform ANEXPLO Genotoul (Toulouse, France), L. van den Berghe and C. Segura from the Inserm UMR1037 vectorology plateau (Toulouse), L. Fontaine from the Inserm UMR1048 histology plateau (Toulouse), J.J. Maoret and F. Martin from the Inserm UMR1048 GeT-TQ plateau of the GeT platform Genotoul (Toulouse) and C. Pécher and M. Zanoun from the TRI platform

Genotoul (Toulouse). We also thank W. Claycomb for providing HL-1 cells and E. Bahraoui, F. Gross and C. Müller for helpful discussion.

This work was supported by Association Française contre les Myopathies (AFM-Telethon), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Région Midi-Pyrénées, European funding (REFBIO). E.R.G. had a fellowship from AFM-Téléthon. F.H. had fellowships from the Région Midi-Pyrénées and from the Ligue Nationale Contre le Cancer. F.T. had a fellowship from ARC.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1, Table S1, Table S2

REFERENCES

1. Ziaeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13(6):368-78.
2. Roncalli J, Tongers J, Losordo DW. Update on gene therapy for myocardial ischaemia and left ventricular systolic dysfunction or heart failure. *Arch Cardiovasc Dis.* 2010;103(8-9):469-76.
3. Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation.* 2013;128(4):388-400.
4. Eckhouse SR, Jones JA, Spinale FG. Gene targeting in ischemic heart disease and failure: translational and clinical studies. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(1):1-11.
5. Rubanyi GM. Mechanistic, technical, and clinical perspectives in therapeutic stimulation of coronary collateral development by angiogenic growth factors. *Mol Ther.* 2013;21(4):725-38.
6. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, et al. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation.* 2011;124(3):304-13.
7. Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, Wagner K, Greenberg B, Jessup M, et al. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res.* 2014;114(1):101-8.
8. Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet.* 2016;387(10024):1178-86.
9. Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Pogoda JM, et al. Prevalence of AAV1 neutralizing antibodies and consequences for a clinical trial of gene transfer for advanced heart failure. *Gene Ther.* 2016;23(3):313-9.

10. Rincon MY, VandenDriessche T, Chuah MK. Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovasc Res.* 2015;108(1):4-20.
11. Yla-Herttuala S. Gene Therapy for Heart Failure: Back to the Bench. *Mol Ther.* 2015;23(10):1551-2.
12. Renaud-Gabardos E, Hantelys F, Morfoisse F, Chaufour X, Garmy-Susini B, Prats AC. Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. *World J Exp Med.* 2015;5(1):11-20.
13. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med.* 2003;9(5):604-13.
14. Chae JK, Kim I, Lim ST, Chung MJ, Kim WH, Kim HG, et al. Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(12):2573-8.
15. Kupatt C, Hinkel R, Pfosser A, El-Aouni C, Wuchrer A, Fritz A, et al. Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(5):414-22.
16. Lee JS, Kim JM, Kim KL, Jang HS, Shin IS, Jeon ES, et al. Combined administration of naked DNA vectors encoding VEGF and bFGF enhances tissue perfusion and arteriogenesis in ischemic hindlimb. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;360(4):752-8.
17. Rayssac A, Neveu C, Pucelle M, Van den Berghe L, Prado-Lourenco L, Arnal JF, et al. IRES-based vector coexpressing FGF2 and Cyr61 provides synergistic and safe therapeutics of lower limb ischemia. *Mol Ther.* 2009;17(12):2010-9.
18. Kukula K, Chojnowska L, Dabrowski M, Witkowski A, Chmielak Z, Skwarek M, et al. Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD). *Am Heart J.* 2011;161(3):581-9.
19. Bornes S, Prado-Lourenco L, Bastide A, Zanibellato C, Iacovoni JS, Lacazette E, et al. Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ Res.* 2007;100(3):305-8.
20. Creancier L, Morello D, Mercier P, Prats AC. Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J Cell Biol.* 2000;150(1):275-81.
21. Morfoisse F, Kuchnio A, Frainay C, Gomez-Brouchet A, Delisle MB, Marzi S, et al. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1alpha-independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep.* 2014;6(1):155-67.
22. Allera-Moreau C, Chomar P, Audinot V, Coge F, Gillard M, Martineau Y, et al. The use of IRES-based bicistronic vectors allows the stable expression of recombinant G-protein coupled receptors such as NPY5 and histamine 4. *Biochimie.* 2006;88(6):737-46.

23. Allera-Moreau C, Delluc-Clavieres A, Castano C, Van den Berghe L, Golzio M, Moreau M, et al. Long term expression of bicistronic vector driven by the FGF-1 IRES in mouse muscle. *BMC Biotechnol.* 2007;7:74.
24. Delluc-Clavieres A, Le Bec C, Van den Berghe L, Conte C, Allo V, Danos O, et al. Efficient gene transfer in skeletal muscle with AAV-derived bicistronic vector using the FGF-1 IRES. *Gene Ther.* 2008;15(15):1090-8.
25. Boal F, Roumegoux J, Alfarano C, Timotin A, Calise D, Anesia R, et al. Apelin regulates FoxO3 translocation to mediate cardioprotective responses to myocardial injury and obesity. *Sci Rep.* 2015;5:16104.
26. Ceylan-Isik AF, Kandadi MR, Xu X, Hua Y, Chicco AJ, Ren J, et al. Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;63:4-13.
27. Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, et al. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett.* 2010;584(11):2363-70.
28. Li L, Zeng H, Hou X, He X, Chen JX. Myocardial injection of apelin-overexpressing bone marrow cells improves cardiac repair via upregulation of Sirt3 after myocardial infarction. *PLoS One.* 2013;8(9):e71041.
29. Pchejetski D, Foussal C, Alfarano C, Lairez O, Calise D, Guilbeau-Frugier C, et al. Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur Heart J.* 2012;33(18):2360-9.
30. Zeng H, He X, Hou X, Li L, Chen JX. Apelin gene therapy increases myocardial vascular density and ameliorates diabetic cardiomyopathy via upregulation of sirtuin 3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;306(4):H585-97.
31. Niwano K, Arai M, Koitabashi N, Watanabe A, Ikeda Y, Miyoshi H, et al. Lentiviral vector-mediated SERCA2 gene transfer protects against heart failure and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Mol Ther.* 2008;16(6):1026-32.
32. Lucas A, Mialet-Perez J, Daviaud D, Parini A, Marber MS, Sicard P. Gadd45gamma regulates cardiomyocyte death and post-myocardial infarction left ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2015;108(2):254-67.
33. Dalzell JR, Rocchiccioli JP, Weir RA, Jackson CE, Padmanabhan N, Gardner RS, et al. The Emerging Potential of the Apelin-APJ System in Heart Failure. *J Card Fail.* 2015;21(6):489-98.
34. House SL, Bolte C, Zhou M, Doetschman T, Klevitsky R, Newman G, et al. Cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 protects against myocardial dysfunction and infarction in a murine model of low-flow ischemia. *Circulation.* 2003;108(25):3140-8.
35. Prats AC, Van den Berghe L, Rayssac A, Ainaoui N, Morfisse F, Pujol F, et al. CXCL4L1-fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Microvasc Res.* 2013;89:25-33.
36. Kumar P, Woon-Khiong C. Optimization of lentiviral vectors generation for biomedical and

clinical research purposes: contemporary trends in technology development and applications. *Curr Gene Ther.* 2011;11(2):144-53.

37. Mathison M, Singh VP, Gersch RP, Ramirez MO, Cooney A, Kaminsky SM, et al. "Triplet" polycistronic vectors encoding Gata4, Mef2c, and Tbx5 enhances postinfarct ventricular functional improvement compared with singlet vectors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;148(4):1656-64 e2.

38. Merentie M, Lottonen-Raikaslehto L, Parviainen V, Huusko J, Pikkariainen S, Mendel M, et al. Efficacy and safety of myocardial gene transfer of adenovirus, adeno-associated virus and lentivirus vectors in the mouse heart. *Gene Ther.* 2016;23(3):296-305.

39. Hinkel R, Trenkwalder T, Kupatt C. Gene therapy for ischemic heart disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2011;11(6):723-37.

40. Morgan RA, Couture L, Elroy-Stein O, Ragheb J, Moss B, Anderson WF. Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(6):1293-9.

41. de Felipe P, Luke GA, Hughes LE, Gani D, Halpin C, Ryan MD. E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol.* 2006;24(2):68-75.

42. Tardieu M, Zerah M, Husson B, de Bournonville S, Deiva K, Adamsbaum C, et al. Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum Gene Ther.* 2014;25(6):506-16.

43. Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, Lepetit H, Lavisce S, Buttery PC, et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet.* 2014;383(9923):1138-46.

44. Conte C, Riant E, Toutain C, Pujol F, Arnal JF, Lenfant F, et al. FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1alpha. *PLoS One.* 2008;3(8):e3078.

45. Kuba K, Zhang L, Imai Y, Arab S, Chen M, Maekawa Y, et al. Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res.* 2007;101(4):e32-42.

46. Atluri P, Morine KJ, Liao GP, Panlilio CM, Berry MF, Hsu VM, et al. Ischemic heart failure enhances endogenous myocardial apelin and APJ receptor expression. *Cell Mol Biol Lett.* 2007;12(1):127-38.

47. Drozdov I, Didangelos A, Yin X, Zampetaki A, Abonnenc M, Murdoch C, et al. Gene network and proteomic analyses of cardiac responses to pathological and physiological stress. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6(6):588-97.

48. Herrero I, Rosello-Lleti E, Ortega A, Tarazon E, Molina-Navarro MM, Trivino JC, et al. Gene expression network analysis reveals new transcriptional regulators as novel factors in human ischemic cardiomyopathy. *BMC Med Genomics.* 2015;8:14.

49. Martineau Y, Le Bec C, Monbrun L, Allo V, Chiu IM, Danos O, et al. Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced

mRNAs. Mol Cell Biol. 2004;24(17):7622-35.

50. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(6):2979-84.

51. Picault FX, Chaves-Almagro C, Progetti F, Prats H, Masri B, Audigier Y. Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. Eur J Cancer. 2014;50(3):663-74.

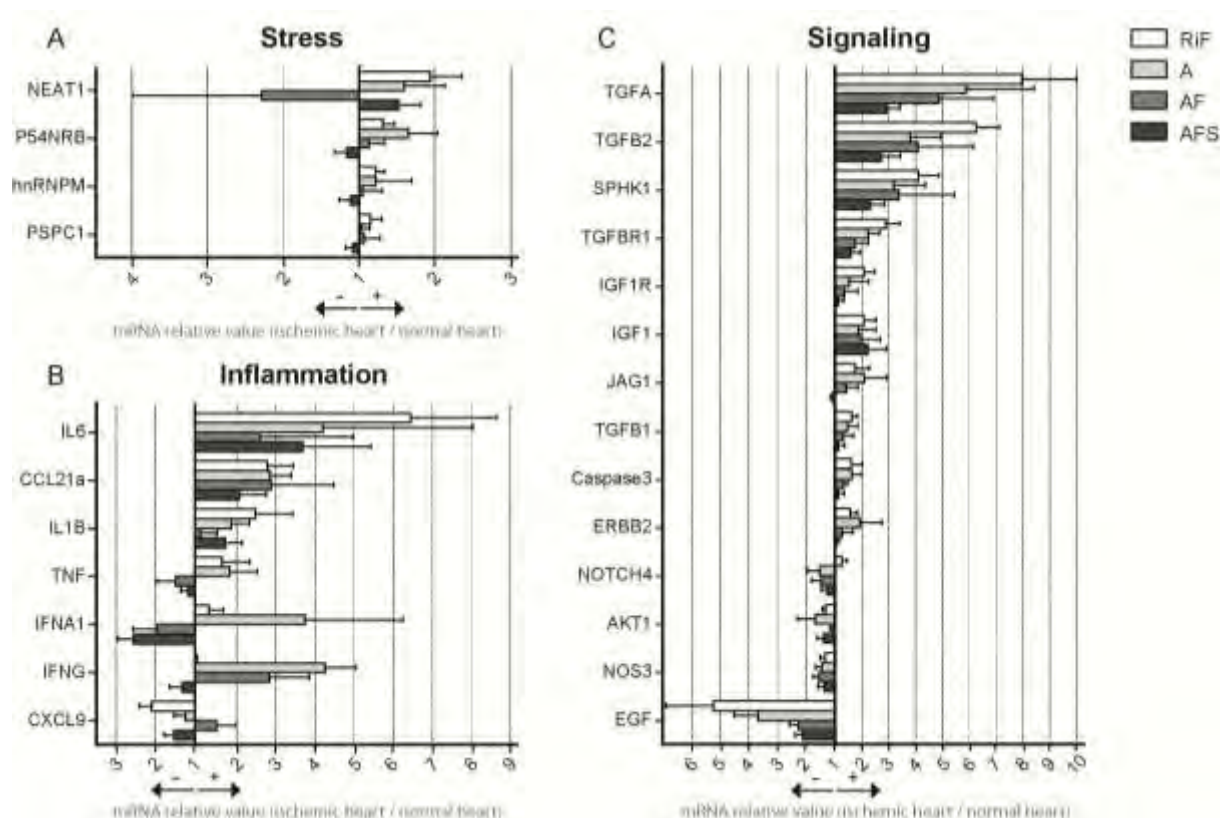


Figure S1. Effect of treatment with therapeutic vectors on ischemic heart transcriptome.

A-C. Total RNA was purified from ischemic areas after 7 weeks of therapeutic vectors treatment. cDNA was synthesized and used for a Fluidigm DELTAgene AssayTM which is a PCR array dedicated to genes related to angiogenesis, anti-angiogenesis, cardiac remodeling and function or fibrosis (shown in Fig. 6) stress (A), inflammation (B) or signaling (C). Messenger RNA levels are presented by histograms for treatment with lentivector control (RiF, white boxes), apelin (A, light grey boxes), apelin-FGF2 (AF, dark grey boxes) or apelin-FGF2-SERCA2a (AFS, black boxes) as the fold-change of repression (on the left of the axis) or induction (on the right of the axis) normalized to the group without myocardial infarction (mean \pm standard error of the mean, n=3-6 mice per group). The detailed values are presented in Table S1.

Résultats : Chapitre 3 Bénéfices thérapeutiques et régulation transcriptomique par le transfert de gène combiné d'apeline, FGF2 et SERCA2a dans le cœur ischémique murin

Lenti	RiF		A		AF		AFS	
Target	RQ*	SEM	RQ*	SEM	RQ*	SEM	RQ*	SEM
AKT1	-1,32	0,103	-1,68	0,625	-1,07	0,0857	-1,39	0,235
α -myHC	-2,18	0,142	-4,22	0,99	-2,19	0,484	-1,51	0,169
ANG	3,27	0,761	4,64	1,82	2,31	1,12	1,78	0,323
ANGPT1	-2,12	0,389	-2,15	0,241	-1,29	0,377	-1,43	0,313
ANGPT2	2,34	0,589	2,96	1,31	2,05	0,828	1,74	0,434
ANP	50,1	8,42	31,6	12	25,7	14,8	14,6	6,22
ANPEP	2,32	0,334	2,21	0,875	2,39	0,979	1,53	0,201
Apelin	-2,75	0,324	-2,69	1,09	-1,46	0,291	-2,14	0,483
APJ (aplnr)	-2,1	0,28	-2,71	0,671	-1,61	0,177	-1,28	0,174
α -skeletal actin	2,25	0,77	1,55	0,602	1,22	0,345	1,97	0,541
ATP2a2 (SERCA2)	-2,5	0,391	-3,8	1,19	-1,79	0,395	-1,7	0,29
BAI1	1,01	0,261	3,48	2,07	2,82	1,33	0,99	0,265
β -myHC	26,7	2,39	20,5	9,01	15,6	8,82	9,06	2,94
BNP	3,87	0,406	3,28	1,16	2,21	1,02	2,13	0,368
Caspase3	1,6	0,401	1,63	0,354	1,29	0,168	1,12	0,221
CCL21a	2,78	0,671	2,84	0,554	2,87	1,6	2,07	0,676
CCR7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cdk4	-0,989	0,0926	-1,12	0,223	-1,12	0,223	-1,32	0,21
Col18a1	4,54	1,5	5,97	3,21	2,67	1,15	1,52	0,272
Col4a3	2,67	0,293	3,09	0,778	1,71	0,688	1,91	0,531
Col1a1	8,64	2,07	6,93	2,47	5,65	3,04	4,67	1,88
Col3a1	7,2	1,56	7,87	3,07	5,23	2,75	4,6	1,91
CTGF	17,3	3,18	12,2	4,82	9,42	5,52	5,84	1,92
cTnT	-1,24	0,0731	-1,91	0,487	-1,41	0,0745	-1,33	0,148
CXCL5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CXCL9	-2,09	0,316	-1,24	0,29	1,48	0,508	-1,52	0,261
Cyr61	1,95	0,336	2	0,512	1,45	0,559	1,56	0,456
EDN1	1,93	0,419	2,19	0,742	1,27	0,294	1,43	0,293
EFNA1	-1,04	0,077	-1,09	0,17	-1,07	0,116	-1,13	0,0977
EFNB2	-1,06	0,0869	-1,34	0,257	-1,15	0,0957	-1,14	0,13
EGF	-5,24	1,65	-3,67	0,836	-2,27	0,303	-2,12	0,264
EPHB4	-1,06	0,137	-1,28	0,339	-1,18	0,0763	-1,39	0,244
ERBB2 (HER2)	1,55	0,269	1,92	0,824	1,26	0,394	1,04	0,116
FGF1	-1,13	0,0759	-1,5	0,198	-1,21	0,0795	-1,36	0,142
FGF2 (bFGF)	2,8	0,639	3,02	1,33	1,76	0,756	1,48	0,392
FGFR3	1,51	0,263	1,52	0,545	1,27	0,535	1,08	0,255
FLT1	-1,17	0,106	-1,57	0,155	-1,65	0,29	-1,27	0,163
FN1	20,8	8,22	21,9	9,88	9,02	5,52	4,81	1,54
HAS1	4,25	1,11	3	1,4	3,21	1,97	2,56	0,707
HGF	4,77	1,23	5,3	2,2	2,56	0,946	2,62	0,82
HIF1A	1,66	0,285	1,73	0,344	1,22	0,236	1,11	0,152

Résultats : Chapitre 3 Bénéfices thérapeutiques et régulation transcriptomique par le transfert de gène combiné d'apeline, FGF2 et SERCA2a dans le cœur ischémique murin

HIF2A	-1,57	0,0476	-1,66	0,254	-1,77	0,196	-1,63	0,208
hnRNPM	1,23	0,115	1,23	0,474	1,06	0,257	-1,1	0,149
HPSE	2,76	0,435	2,32	0,693	2,15	0,7	2,44	0,685
IFNA1	1,28	0,375	3,74	2,51	-1,95	0,613	-2,55	0,407
IFNG	0,95	0,0434	4,26	0,795	2,84	1,02	-1,31	0,325
IGF1	2,06	0,457	1,87	0,644	1,98	0,706	2,2	0,704
IGF1R	2,07	0,4	1,53	0,72	1,33	0,521	1,12	0,193
IL1B	2,47	0,958	1,85	0,466	1,08	0,422	1,7	0,438
IL6	6,45	2,2	4,2	3,84	2,6	2,37	3,69	1,74
ITGAV	2,52	0,436	2,81	0,95	2,19	0,631	1,63	0,241
JAG1	1,76	0,527	2,08	0,854	1,43	0,412	-1,07	0,0882
KDR	-1,85	0,223	-2	0,145	-2,15	0,409	-1,3	0,188
Ki67	1,48	0,343	3,5	1,62	1,4	0,619	1,51	0,435
LECT1	1,28	0,541	1,82	1,35	1,74	0,512	1,22	0,393
MMP14	3,23	0,924	2,61	0,847	2,01	0,848	1,84	0,531
MMP2	4,74	0,928	3,43	0,993	3,3	1,59	2,56	0,826
MMP9	1,89	0,568	1,14	0,108	1,31	0,448	1,61	0,431
NEAT1	1,95	0,415	1,6	0,535	-5,1	3,07	1,52	0,287
NOS3	-1,33	0,179	-1,45	0,215	-1,55	0,203	-1,36	0,225
NOTCH4	1,25	0,198	-1,52	0,427	-1,47	0,352	-1,26	0,205
NRP1	-1,61	0,201	-1,77	0,204	-1,46	0,21	-1,31	0,204
NRP2	1,11	0,154	1,38	0,369	1,00	0,197	1,2	0,149
P54NRB	1,32	0,153	1,65	0,382	1,14	0,205	-1,15	0,153
PAI1 (SERPINE1)	13,2	4,000	17,2	6,66	9,93	7,21	4,74	1,87
PDGFA	1,3	0,258	1,59	0,674	1,31	0,49	1,02	0,147
PDPN (Podoplanin)	4,28	0,999	3,93	1,43	3,64	1,62	1,82	0,376
PECAM1	-1,17	0,0803	-1,09	0,207	-1,24	0,136	-1,18	0,154
PF4	1,15	0,283	1,66	0,721	1,21	0,317	1,29	0,261
PGF	-1,4	0,251	-1,35	0,279	-1,23	0,108	-1,42	0,167
PLAU (uPA)	-1,46	0,268	-1,54	0,397	-1,21	0,165	-1,46	0,246
PROX1	-1,71	0,152	-2,11	0,382	-1,7	0,287	-1,78	0,326
PSPC1	1,16	0,151	1,03	0,12	1,08	0,207	-1,07	0,0973
PTRIP3'	2,16	0,519	2,23	0,876	1,62	0,289	1,35	0,162
S1PR1	1,37	0,16	1,22	0,321	1,06	0,148	1,17	0,141
SPHK1	4,1	0,765	3,18	1,2	3,37	2,07	2,29	0,554
TEK	-1,48	0,111	-1,6	0,135	-1,32	0,0769	-1,3	0,155
TGFA	7,97	2,03	5,87	2,54	4,87	2,05	2,92	0,491
TGFB1	1,62	0,205	1,46	0,388	1,3	0,375	1,11	0,244
TGFB2	6,26	0,878	3,8	1,14	4,07	2,09	2,72	0,711
TGFBR1	2,88	0,537	2,23	0,434	1,75	0,493	1,59	0,331
THBS1	33,5	9,96	38,4	15,1	21	13,9	12,7	5,42
THBS2	2,64	0,711	2,59	0,727	1,93	0,632	1,83	0,705
TIE1	-1,44	0,193	-1,67	0,26	-1,55	0,104	-1,44	0,267
TIMP1	16,7	4,52	11,9	4,52	4,63	3,98	6,98	2,4

TNF	1,62	0,716	1,81	0,725	-1,48	0,501	-1,16	0,184
VASH1	-1,14	0,0652	-1,54	0,452	-1,2	0,178	-1,15	0,195
VEGFA	1,07	0,217	-1,42	0,204	-1,65	0,363	1,05	0,143
VEGFB	-1,77	0,109	-2,45	0,585	-1,68	0,181	-1,75	0,239
VEGFC	-1,1	0,123	-1,19	0,141	-1,16	0,144	1,02	0,225
VEGFD (FIGF)	3,4	0,932	4,95	1,81	3,56	1,67	3,05	1,31
VEGFR3	2,06	0,393	2,08	0,782	1,63	0,496	1,34	0,286

* RQ<1 were replaced by -1/RQ

ND: non determined

Table S1. Effect of treatment with therapeutic vectors on ischemic heart transcriptome.

Total RNA was purified from ischemic areas after 7 weeks of therapeutic vectors treatment. cDNA was synthesized and used for a Fluidigm DELTAgene AssayTM which is a PCR array dedicated to genes related to angiogenesis, anti-angiogenesis, cardiac remodeling and function or fibrosis (Fig. 6) stress, inflammation or signaling (Fig. S1). Relative quantities (RQ) of mRNAs were normalized to the group without myocardial infarction (mean \pm standard error of the mean, n=3-6 mice per group). RQ values inferior to 1 were replaced by -1/RQ to obtain the fold change of repression. The standard error of the mean is indicated (SEM).

Target	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
AKT1	AGAACTCTAGGCATCCCTTCC	CGTTGGCATACTCCATGACA
α -myHC	AATCCTAATGCAAACAAGGG	CAGAAGGTAGGTCTCTATGTC
ANG	TCCTGACTCAGCACCATGAC	ACATCTTTGCAGGGTGAGGTTA
ANGPT1	ACAACACCGGGAAGATGGAA	TTCACCAGAGGGATTCCCAAAA
ANGPT2	GAACCAGACAGCAGCACAAA	TCGAGTCTTGTCGTCTGGTTTA
ANP	GGGGGTAGGATTGACAGGAT	CAGAGTGGGAGAGGCAAGAC
ANPEP	TGGGACTTTGTCCGAAGCA	TCCCTGGATGAGATTGGCAAA
Apelin	GCAGGAGGAAATTCGCAGAC	ACTTGGCGAGCCCTTCAA
APJ (aplnr)	TTGACTGGCCTTTTGGAACC	GCAAAAGACACTGGCGTACA
α -skeletal actin	TACCACCGGCATCGTGTG	CCAGGTCCAGACGCATGAT
ATP2a2 (SERCA2)	CGGTCCAAGAGTCTCCTTCTA	GCACAATCCACTCCATCGAA
BAI1	GGTCCTGAGAAGCAAACCAA	GACCATTCGTTCCAGTTTCCA
β -myHC	ACTGTCAACACTAAGAGGGTCA	TTGGATGATTTGATCTTCCAGGG
BNP	AAGCTGCTGGAGCTGATAAGA	GTTACAGCCCAAACGACTGAC
Caspase3	TGACTGGAAAGCCGAACTC	AGCCTCCACCGGTATCTTCTG
CCL21a	GTCAGGACTGCTGCCTTAAGTA	GCTTCCTATAGCCTCGACAA
CCR7	GGCTGCCTCAGCCAGGAACG	TCCGCCTCCATGCTCACC GA
Cdk4	AGTTTCTAAGCGGCCTGGAT	TGACGGTCCCATTACTTG
Col18a1	CAGGACCAAAGGGTGACAAA	TTCCAGGTGGAAGAGGTCAA
Col4a3	GCTGGTACAAAGGGCAACAA	TAAGCCTGGCAATCCATCCA
Col1a1	CTCAAGATGTGCCACTCTGACT	CTCCATGTTGCAGTAGACCTTG
Col3a1	GATGGAAACCTGGATCAGA	GCACCAGGAGAACCATTTTC
CTGF	AAGCTGACCTGGAGGAAAACA	TGCAGCCAGAAAGCTCAAAC
cTnT	AAGATGCTGAAGAAGGTCCAGTAG	TCGATCAGAGTCTGTAGCTCATTC
CXCL5	GGCATTCTGTGTGCTGTTTAC	TGCGGCTATGACTGAGGAA
CXCL9	AGCCCCAATTGCAACAAAAC	TCTTCACATTTGCCGAGTCC
Cyr61	CCACACCAAGGGGTTGGAA	CACAGGGTCTGCCTTCTGAC
EDN1	CCTGGACATCATCTGGGTCAA	AACGCTTGGACCTGGAAGAA
EFNA1	TGGGCAAGGAGTTCAAGGAA	GCACTGGGATTCTGATGGTA
EFNB2	TGCCAGACAAGAGCCATGAA	GTCTTGTTGGACCGTGATTCC
EGF	GGAGAGACTGCTGAGTGTC	AGCCAGCACACACTCATCTA
EPHB4	CCTCACGGAATTCATGGAGAAC	ACCAGCTGGATGACTGTGAA
ERBB2 (HER2)	ATTCTCAGACGCCGTTTCA	TTGGCCCCAAAGGTCATCA
FGF1	TGGACACCGAAGGGCTTTTA	GCATGCTTCTTGGAGGTGTAA
FGF2 (bFGF)	TCTTCCTGCGCATCCATCC	GCACACACTCCCTTGATAGACA
FGFR3	AGGATTTAGACCGCATCCTCAC	CCTGGCGAGTACTGCTCAAA
FLT1	TTGCACGGGAGAGACTGAAA	GCCAAATGCAGAGGCTTGAA
FN1	CGTCATTGCCCTGAAGAACA	AAGGGTAACCAAGTTGGGGAA
GAPDH	AGGTGCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
HAS1	TAACCTACGTCCCCGTGTTGC	CAGCAAGGTGGTAGGCTTCA
HGF	CATCAAATGCCAGCCTTGGA	TCTTTACCGCGATAGCTCGAA
HIF1A	TCGACACAGCCTCGATATGAA	TTCCGGCTCATAACCCATCA
HIF2A	GTGACCCAAGACGGTGACAT	TCCCAAAACCAGAGCCGTTT

Résultats : Chapitre 3 Bénéfices thérapeutiques et régulation transcriptomique par le transfert de gène combiné d'apeline, FGF2 et SERCA2a dans le cœur ischémique murin

hnRNP	GATGCCAACCATCTGAGCAAA	CCAAATCCTATGCCTTCCATTCC
HPRT	TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC	GGACGCAGCAACTGACATTTT
HPSE	GCCTCGAGGGAAGACAGTTAAA	TGCCATGTAAGAGAGTCGATCAC
IFNA1	TCCACCAGCAGCTCAATGAC	TCTTCCTGGGTGAGGGGAAA
IFNG	GGCACAGTCATTGAAAGCCTA	GCCAGTTCCTCCAGATATCCA
IGF1	GAGCTGGTGGATGCTCTTCA	CTCCGAATGCTGGAGCCATA
IGF1R	ATGGAGCCTGAGAACATGGA	CCTTGTGTCCTGAGTGTCTT
IL1B	TGGCAACTGTTCTGAACTCA	GGGTCCGTCAACTTCAAAGAAC
IL6	CCAGAAACCGCTATGAAGTTCC	GTTGTCACCAGCATCAGTCC
ITGAV	AAAGGCAGATGGCAAGGGAA	GGCTCCCTTCTGCTTGAGTTTA
JAG1	TCCCAAGCATGGGTCTTGTA	GATGCACTTGTCGAGTACA
KDR	ATTTACCTGGCACTCTCCA	TCCCAGGAAAGGGTTTCACA
Ki67	ACACCAGAGACCATGCAACA	AAGCCCTGGTCTCACAATG
LECT1	CCTGCCGATTTTCTGGCTTA	AGAGGGAGCACTGTTTCTCA
MMP14	CAAGGCTGATTTGGCAACCA	GCCTTGATCTCAGTCCAAAC
MMP2	CGAGGACTATGACCGGGATA	GGGCACCTTCTGAATTTCCA
MMP9	TCCCCAAAGACCTGAAAACC	GGGTGTAACCATAGCGGTAC
NEAT1	GGGAAGCTGATTGCCAAGAA	ATGGTTTCAGAGCCCACAAC
NOS3	GGGATTCTGGCAAGACAGACTA	GCAGCCAAACACCAAAGTCA
NOTCH4	ACCTGCTTGCAACCTTCCA	GGTGCACTCATTGACCTCCA
NRP1	CCTGTATCCTGGGAACTGGTA	GCCCAACATTCCAGAGCAA
NRP2	GTGGATCAGCAGCGCTAAC	GCCATCACTCTGCAGTTTCAA
P54NRB	TGGTACTCCAGCTCCTCCA	CAGCTTGGCCAAAACGTTCA
PAI1 (SERPINE1)	CAGACAATGGAAGGGCAACA	GAGGTCCACTTCAGTCTCCA
PDGFA	TGTAACACCAGCAGCGTCAA	GGCTTCTTCTGACATACTCCA
PDPN (Podoplanin)	GGGATGAAACGCAGACAACAG	TTAGGGCGAGAACCTTCC
PECAM1	GCACAGTGATGCTGAACAAC	GTCACCTTGGGCTTGGATAC
PF4	CCAGCCTGGAGGTGATCAA	GGCAAATTTTCTCCATTCTTCA
PGF	CCAATCGGGATCCACATTTCTA	GCCTTTGTCGTCTCCAGAATA
PLAU (uPA)	TAGCCTAGGCCTGGGGAAA	AGGCCAATCTGCACATAGCA
PROX1	GCCCTCAACATGCACTACAAC	CGTGATCTGCGCAACTTCC
PSPC1	TCCCCGTGGAGCAATAAACA	ATACCCATCATTGGAGGAGGAC
PTRIP3'	TTAAGACCAATGACTTACAAG	GGAGTGAATTAGCCCTTC
S1PR1	CGGTGTAGACCCAGAGTCC	GAGAGGCCTCCGAGAAACA
SPHK1	GGCAGCTTCTGTGAACCACTA	CAGCAGGTTCATGGGTGACA
TEK	GTTGGATGGCAATCGAATCAC	CCAGAGCAATACCCATAGGAC
TGFA	CCCTGGCTGTCCTCATTATCA	CAGTGTTTGCGGAGCTGAC
TGFB1	GCTGCGCTTGACAGAGATTAA	GTAACGCCAGGAATTGTTGCTA
TGFB2	GCCCATATCTATGGAGTTCAGACA	AGCGGAAGCTTCGGGATTTA
TGFB1R	AATTGCTCGACGCTGTTCTA	ACCGATGGATCAGAAGGTACA
THBS1	CCCCAGAAGACATTCTCAGGAA	CGTTCACCACGTTGTTGTCA
THBS2	GACTGCACGTCATGGTGAAC	CCCAATGAGCTCCAAAAGGAAC
TIE1	CCTTTGCTCAGATCGCACTA	CTCAAACAGCGACATGTTTAC
TIMP1	TCCCCAGAAATCAACGAGACC	CATTTCCACAGCCTTGAATCC

TNF	CAAATGGCCTCCCTCTCATCA	TGGGCTACAGGCTTGTCAC
VASH1	GGCTGCCAAGTTGGGGTGTGTT	AAACCAGGGCGTGGCTCCTGTA
VEGFA	CCAGCACATAGGAGAGATGAG	CTGGCTTTGTTCTGTCTTTCTT
VEGFB	GAGATGTCCCTGGAAGAACACA	TGGCTTCACAGCACTCTCC
VEGFC	AGACGTTCTCTGCCAGCAA	AGGCATCGGCACATGTAGTTA
VEGFD (FIGF)	TCCATTGAGACCCAGAAAGAA	GTGTTATCCACAGCATGTCA
VEGFR3	CTCGCTCGGGACATCTACAAA	GGGCCATCCATTTCAGAGGAA

Table S2. Genes and primer couples of the Fluidigm Deltagene array.

The target gene is indicated in the first column. The corresponding forward and reverse primers are listed in second and third columns, respectively. PTRIP3' corresponds to the 3' region common to the lentivector expression cassettes.

Chapitre 4

Approche de thérapie génique combinée de l'ischémie cardiaque à l'aide de cellules souches mésenchymateuses co-exprimant le triplet apeline-FGF2-Cyr61

Introduction

Les thérapies cellulaires et géniques sont des approches très prometteuses pour traiter l'ischémie du myocarde et l'ischémie critique du membre inférieur. Plusieurs études indiquent un potentiel important des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse pour traiter ces pathologies ischémiques. Ces cellules ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires pour régénérer le tissu, mais elles agissent principalement grâce à un effet paracrine (Estrada *et al.*, 2009; Silvestre *et al.*, 2013).

L'angiogenèse thérapeutique par thérapie génique est par ailleurs une approche pleine de perspectives pour restaurer la revascularisation tissulaire du muscle. Etant donné que les gènes thérapeutiques utilisés codent pour des facteurs angiogéniques qui sont des molécules sécrétées, ils constituent des candidats intéressants pour renforcer l'effet paracrine des cellules souches mésenchymateuses.

Des études ont mis en évidence les effets bénéfiques de l'apeline dans le tissu myocardique. Grâce aux nombreux rôles mentionnés en introduction comme ses pouvoirs pro-angiogéniques et anti-apoptotiques, il est probable que la surexpression de l'apeline puisse favoriser la survie des CSM injectées, et stimuler la revascularisation. Il a également été démontré que la surexpression de FGF2 par un lentivecteur dans les CSM permet d'améliorer la vasculogenèse dans les rats ischémiques en favorisant la survie des cellules transplantées et la différenciation en cellules endothéliales vasculaires (J. C. Zhang *et al.*, 2014). Enfin, l'étude de thérapie génique combinée réalisée au laboratoire, utilisant un vecteur bicistronique exprimant FGF2 et Cyr61, a révélé un effet synergique de ces deux molécules sur l'angiogenèse (Rayssac *et al.*, 2009).

Pour notre étude, nous avons sélectionné ces trois candidats pour concevoir des lentivecteurs tricistroniques basés sur les IRES dans le but de transduire des CSM de rat pour une future transplantation dans le cœur ou le muscle squelettique ischémiques. L'objectif est de démontrer qu'une combinaison de ces trois facteurs améliore la survie des CSM et stimule la revascularisation du tissu ischémique.

Les expériences réalisées à ce jour ont consisté à étudier, dans un premier temps dans des cardiomyocytes HL-1, le pouvoir angiogénique de différentes combinaisons des trois candidats choisis, par des expériences de tubulogenèse *in vitro*. Il s'avère que la combinaison apeline-FGF2-Cyr61 a un potentiel angiogénique *in vitro* très supérieur aux autres combinaisons. Des CSM ont été isolées à partir de fémurs de rat et nous avons montré qu'elles peuvent être transduites avec une efficacité de 99%. Ainsi, le pouvoir pro-angiogénique du lentivecteur tricistronique apeline-FGF2-Cyr61 a pu être testé *in vitro* à partir des milieux conditionnés de CSM transduites, confirmant son potentiel angiogénique très prometteur.

Résultats

Activité pro-angiogénique de milieux conditionnés de cardiomyocytes HL-1 exprimant différentes combinaisons d'apeline, FGF2 et Cyr61

Nous avons tout d'abord testé les différentes constructions de lentivecteurs (Figure 1A) après transduction dans les cardiomyocytes HL-1. 48h après transduction, les ARN ont été extraits et quantifiés par RT-qPCR, avec des couples d'amorces dirigées contre apeline ou FGF2 (Figure 1B et 1C respectivement).

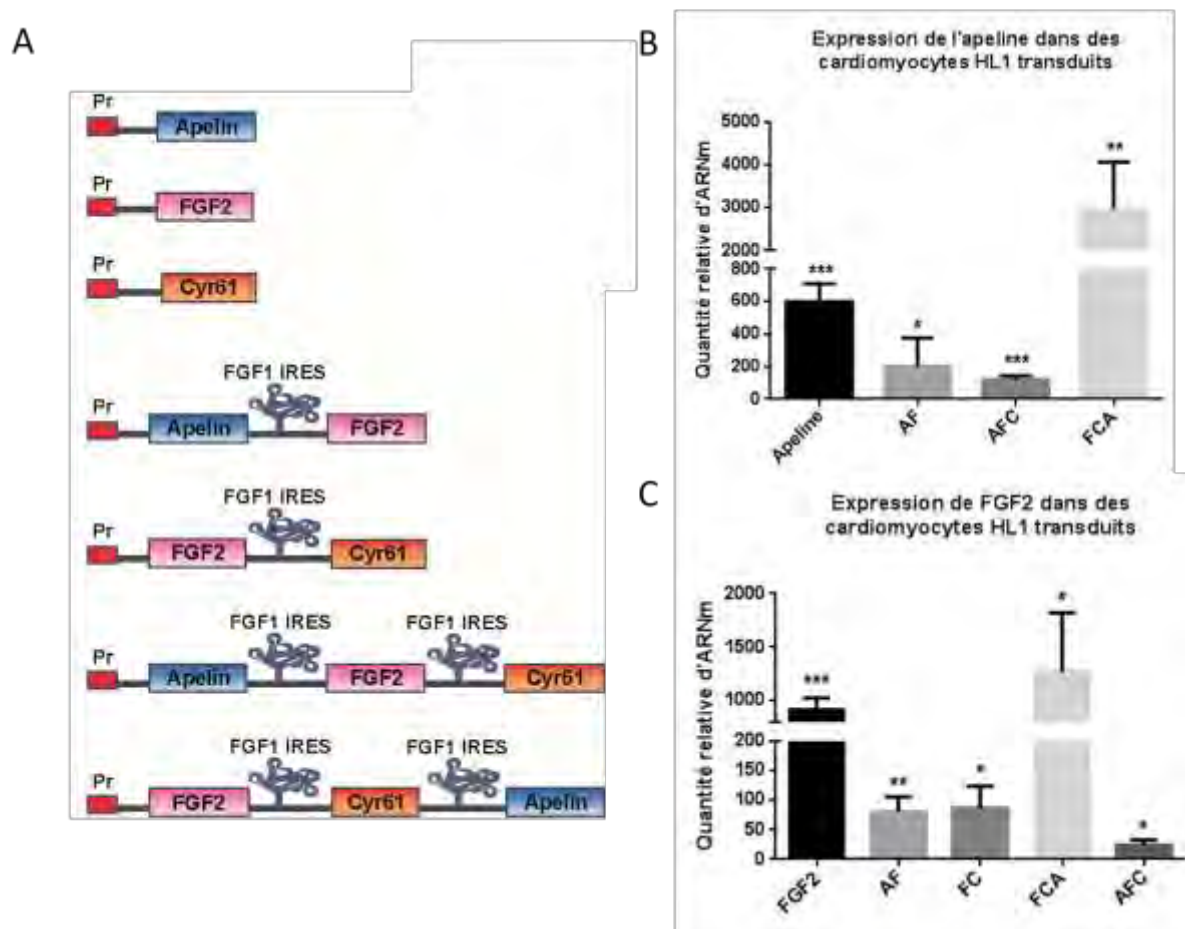


Figure 1 : Analyse par RT-qPCR de la surexpression des lentivecteurs dans les cardiomyocytes HL-1 transduits.

Les cardiomyocytes HL-1 ont été transduits avec des lentivecteurs exprimant différentes combinaisons des gènes apeline, FGF2 et Cyr61 (A). L'ARNm extrait a été quantifié par RT-qPCR avec des couples d'amorces dirigées contre apeline (B) ou FGF2 (C) normalisé par la quantité d'ARNm endogènes dans les cellules non transduites. AF : apeline-FGF2 ; FC : FGF2-Cyr61 ; AFC : apeline-FGF2-Cyr61 ; FCA : FGF2-Cyr61-apeline. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=3 puits par groupe). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs non transduits.

Le gène apeline est surexprimé dans les cardiomyocytes HL1 transduits par les lentivecteurs exprimant apeline, quelle que soit la combinaison mais à des niveaux différents (Figure 1B). La surexpression de l'ARNm apeline par le vecteur monocistronique est significativement plus importante ainsi que celle du vecteur tricistronique apeline-FGF2-Cyr61. Le profil est le même lorsque l'on quantifie l'ARNm FGF2 (Figure 1C), ce qui est cohérent puisque les cistrons se situent sur un même ARNm.

Ces résultats indiquent une très bonne expression des ARNm monocistroniques et de l'ARNm tricistronique FGF2-Cyr61-apeline, une expression moyenne des vecteurs bicistroniques apeline-FGF2 et FGF2-Cyr61, et une expression très faible du vecteur tricistronique apeline-FGF2-Cyr61.

Le pouvoir pro-angiogénique des différentes combinaisons des gènes apeline, FGF2 et Cyr61 a été testé *in vitro*. Après transduction des cardiomyocytes HL-1 par les différents lentivecteurs, le milieu conditionné a été récolté pour être utilisé pour un test de tubulogenèse à partir d'HUVEC (cellules endothéliales de veines ombilicales humaines) sur Matrigel (Figure 2A). Après 24h, l'angiogenèse a été évaluée par la quantification des points de branchement (Figure 2B).

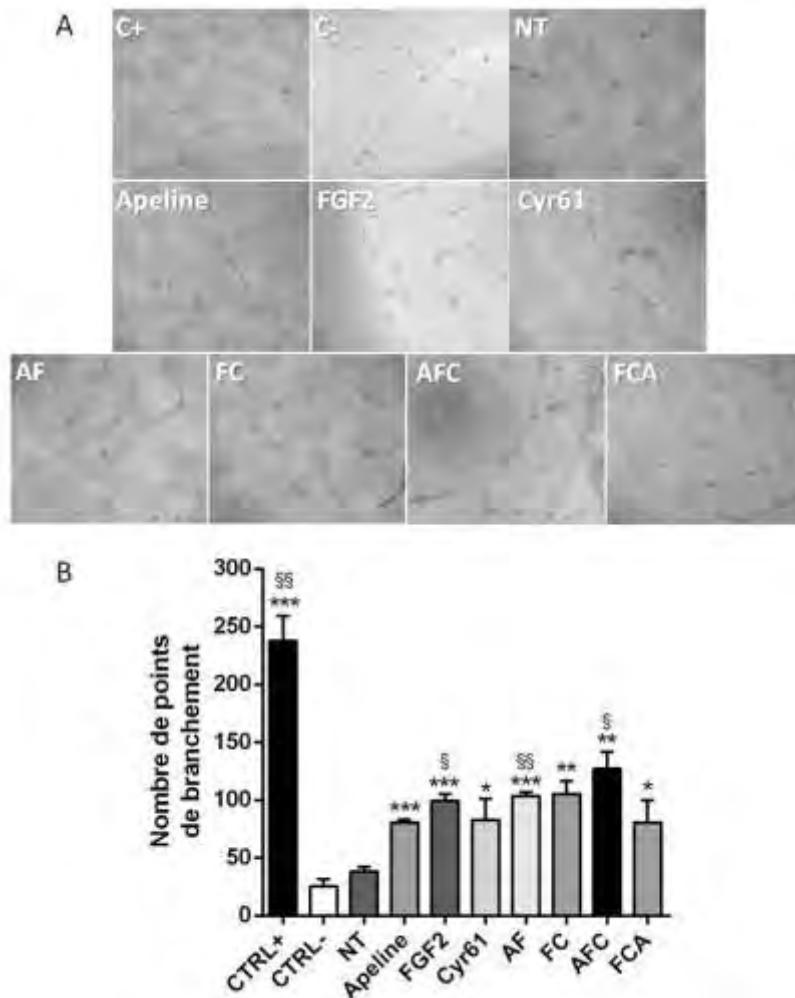


Figure 2 : Analyse de l'effet pro-angiogénique des cardiomyocytes transduits par différentes combinaisons.

Les cardiomyocytes HL-1 ont été transduits par les différentes combinaisons et le milieu conditionné a été utilisé pour cultiver des HUVEC (cellules endothéliales de veines ombilicales humaines) sur du Matrigel (A).

Après 24h, l'angiogenèse a été évaluée par quantification des points de branchement (B).

CTRL+ : contrôle positif ; CTRL- : contrôle négatif ; NT : non transduits ; AF : apeline-FGF2 ; FC : FGF2-Cyr61 ; AFC : apeline-FGF2-Cyr61 ; FCA : FGF2-Cyr61-apeline. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=3 puits par groupe). *p<0,5 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 vs non transduits ; §p<0,5 ; §§p<0,01 vs apeline.

Les résultats montrent que la formation de tubules est significativement plus élevée en présence des surnageants de cardiomyocytes transduits par rapport au surnageant de cardiomyocytes non transduits. Tous les lentivecteurs semblent avoir un effet angiogénique *in vitro*. On observe que les HUVEC ayant été en présence du milieu conditionné FGF2 forment significativement plus de tubules que celles stimulées par les milieux conditionnés apeline ou Cyr61. De plus, la formation de tubules est significativement plus efficace en présence des milieux conditionnés de cardiomyocytes transduits par les lentivecteurs apeline-FGF2-Cyr61 et apeline-FGF2 comparés à l'apeline seule.

De plus ces résultats suggèrent fortement un effet coopératif des gènes thérapeutiques exprimés par le vecteur tricistronique apeline-FGF2-Cyr61. En effet ce lentivecteur est très peu exprimé et est malgré tout responsable d'un effet angiogénique égal ou supérieur à celui de tous les autres lentivecteurs, y compris les vecteurs monocistroniques qui sont très fortement exprimés. Pour mettre en évidence l'activité biologique relative, nous avons calculé le rapport du nombre de points de branchement sur la quantité d'ARNm relative à FGF2 (Figure 3).

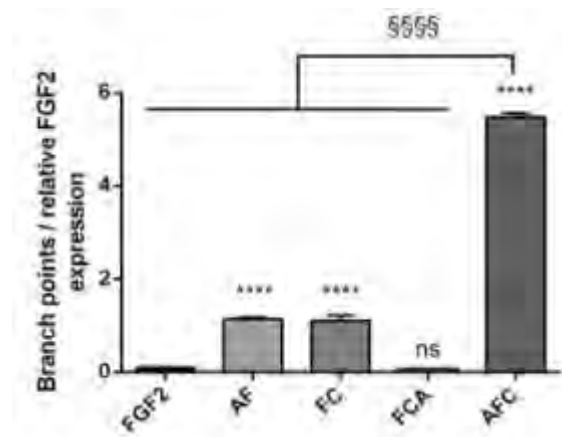


Figure 3 : Activité biologique relative à l'expression de FGF2.

Pour chaque condition, le nombre de points de branchement a été divisé par la quantité d'ARN du FGF2.

AF : apeline-FGF2 ; FC : FGF2-Cyr61 ; AFC : apeline-FGF2-Cyr61 ; FCA : FGF2-Cyr61-apeline. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=3 puits par groupe). ns : non significatif ; ****p<0,0001 vs FGF2 ; §§§§p<0,0001 vs apeline-FGF2-Cyr61.

Ces résultats nous permettent de souligner le fort pouvoir angiogénique du vecteur tricistronique apeline-FGF2-Cyr61 à partir de cardiomyocytes HL-1. Ce lentivecteur apparaît clairement comme le meilleur candidat pour un effet paracrine pro-angiogénique.

Isolement et caractérisation de CSM de rats

Les CSM de rats LEWIS âgés de 8 semaines ont été isolées à partir de la moelle osseuse du fémur, comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Afin de vérifier la présence et la sélection de CSM, les cellules en culture ont été caractérisées à deux passages différents par cytométrie en flux, en fonction de deux marqueurs spécifiques des CSM (CD90 et CD29) et un marqueur non spécifique (CD45, un marqueur des cellules hématopoïétiques) (Figure 4).

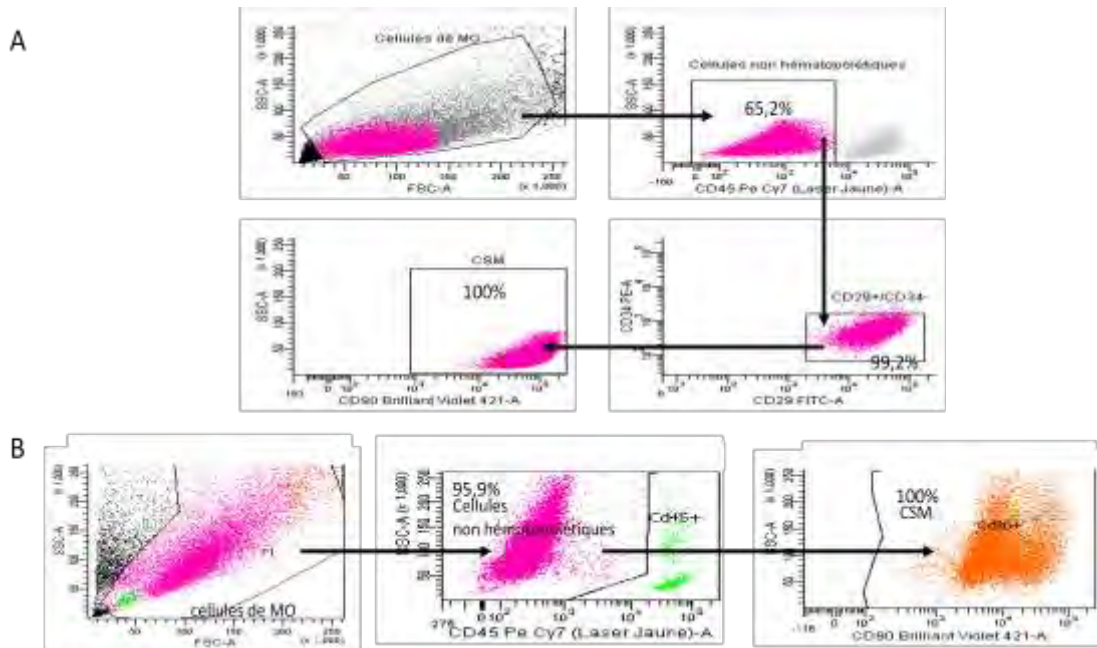


Figure 4 : Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) par cytométrie en flux.

$2,5 \cdot 10^5$ cellules après le premier passage cellulaire (A) et le troisième passage (B) ont été incubées pendant 1h à 4°C avec l'ensemble des anticorps CD90/BV421, CD29/FITC, CD34/PE et CD45/PECy⁷. Par la suite, les populations de cellules ont été analysées à l'aide du cytomètre BD Fortessa et du logiciel DIVA.

BV421 : Brilliant violet 421 ; FITC : Isothiocyanate de fluorescéine ; PE : Phycoérythrine ; PECy⁷ : Phycoérythrine-Cyanine7 ; MO : moelle osseuse.

D'après la littérature, les CSM de rat ont un phénotype CD34⁻, CD90⁺ et CD29⁺ (Mias et al. 2009). Nos résultats mettent en évidence qu'à passage précoce (Figure 4A), 65,2% des cellules sont CD45⁻ donc non hématopoïétiques. Parmi elles, 99,2% sont CD29⁺/CD34⁻, et 100% des cellules CD29⁺ sont CD90⁺. Nous avons donc en culture des CSM contaminées à 34,8% par des cellules hématopoïétiques. Au troisième passage, et après plusieurs changements de milieu, la population de CSM est plus pure puisqu'elle contient 95,9% de cellules non hématopoïétiques identifiées comme des CSM par le marqueur CD90.

Efficacité de transduction des cellules souches mésenchymateuses par un lentivecteur rapporteur

Une fois les CSM caractérisées, nous avons réalisé des tests de transduction pour sélectionner la condition optimale pour le transfert de gène. Pour cela, les CSM ont été transduites après trois passages avec un lentivecteur GFP non dilué (2.10^6 TU/mL) ou dilué au 1/2 et 1/4 (10^6 TU/mL et 5.10^5 TU/mL respectivement) en présence ou non de protamine sulfate à $5\mu\text{g/mL}$ ou à $10\mu\text{g/mL}$. Après 72 heures, le pourcentage de cellules transduites, c'est-à-dire le % de cellules GFP⁺ a été mesuré par cytométrie en flux (Figure 5).

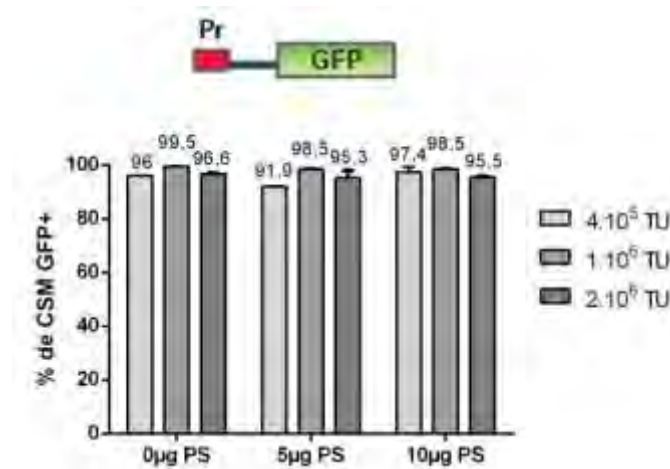


Figure 5 : Test de transduction des cellules souches mésenchymateuses (CSM) par un lentivecteur exprimant la GFP, utilisé à différentes concentrations, en présence ou non de protamine sulfate (PS).

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 6 puits à raison de 2.10^5 cellules/puits. Après 24h, elles ont été transduites avec 2.10^6 TU (transduced units), 1.10^6 TU ou 5.10^5 TU d'un lentivecteur GFP avec ou sans protamine sulfate (0, 5 ou $10\mu\text{g}$) pour un volume final de 1mL. Après 72h, les cellules ont été fixées avec de la formoline 10% et le pourcentage de cellules transduites a été mesuré par FACS.

Nos résultats mettent en évidence une transduction supérieure à 90% quelle que soit la condition choisie. Pour la suite de nos expériences, nous avons sélectionné la condition optimale, c'est-à-dire 1.10^6 TU de lentivecteurs sans protamine sulfate, puisque 99,5% de ces CSM sont transduites.

Analyse de l'activité de différents IRES dans les cellules souches mésenchymateuses

Les lentivecteurs thérapeutiques bicistroniques et tricistroniques que nous avons testés dans les cellules HL-1 sont tous basés sur l'utilisation de l'IRES du FGF1, décrit comme étant efficace dans les cellules musculaires mais qui n'a jamais été testé dans les CSM. Nous avons donc transduit les CSM avec des vecteurs bicistroniques exprimant deux gènes rapporteurs luciférase (*luciférase renilla* et *luciférase firefly*) séparés par l'IRES du FGF1 (déjà utilisé dans

le chapitre 3) ainsi que par d'autres IRES disponibles au laboratoire. L'activité des IRES a été quantifiée par le ratio de la luciférase firefly sur la luciférase *renilla* (Figure 6).

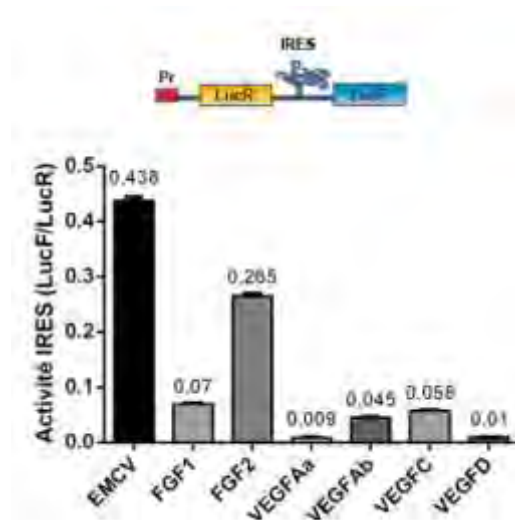


Figure 6 : Activité des IRES dans les cellules souches mésenchymateuses.

Les CSM ont été transduites avec des lentivecteurs exprimant la cassette pCMV-LucR-IRES-LucF. Les IRES testés sont l'IRES d'EMCV (encephalomyocarditis virus), l'IRES A de FGF1 et les IRES de FGF2, VEGFAa, VEGFAb, VEGFC et VEGFD.

Nos résultats mettent en évidence que l'IRES du FGF1 fonctionne dans les CSM, même si elle est modeste par rapport à celle de FGF2 ou EMCV. Elle est cependant supérieure à celle des différents IRES des VEGF. De plus, nous avons montré que cet IRES est activé par l'hypoxie, plus fortement que l'IRES du FGF2 ou EMCV (Hantelys et coll., en préparation). Il est aussi plus actif dans les cœurs ischémiques que dans le cœur sain (Chapitre 3). Il faut donc nuancer ces résultats, sachant que les CSM cultivées en normoxie n'ont subi aucun stress pouvant stimuler l'activité des IRES. Or, la transplantation de CSM dans un tissu ischémique génère un stress important pour la cellule et en particulier un stress hypoxique. Il sera donc intéressant de tester l'activité de ces IRES en hypoxie avant d'envisager éventuellement d'utiliser un autre IRES que FGF1 pour les vecteurs utilisés pour la transduction des CSM.

Activité pro-angiogénique de milieux conditionnés de CSM transduites par différents lentivecteurs thérapeutiques.

Ayant démontré la capacité des CSM à être transduites et à exprimer un transgène sous contrôle de l'IRES du FGF1, nous avons utilisés les différents lentivecteurs mentionnés plus haut pour transduire les CSM, et réalisé une expérience de tubulogenèse à partir de leurs milieux conditionnés. Le milieu conditionné a été récolté pour être utilisé sur des cellules

endothéliales HUVEC sur Matrigel comme ci-dessus (Figure 7A). L'angiogenèse a été évaluée par la quantification des points de branchement (Figure 7B).

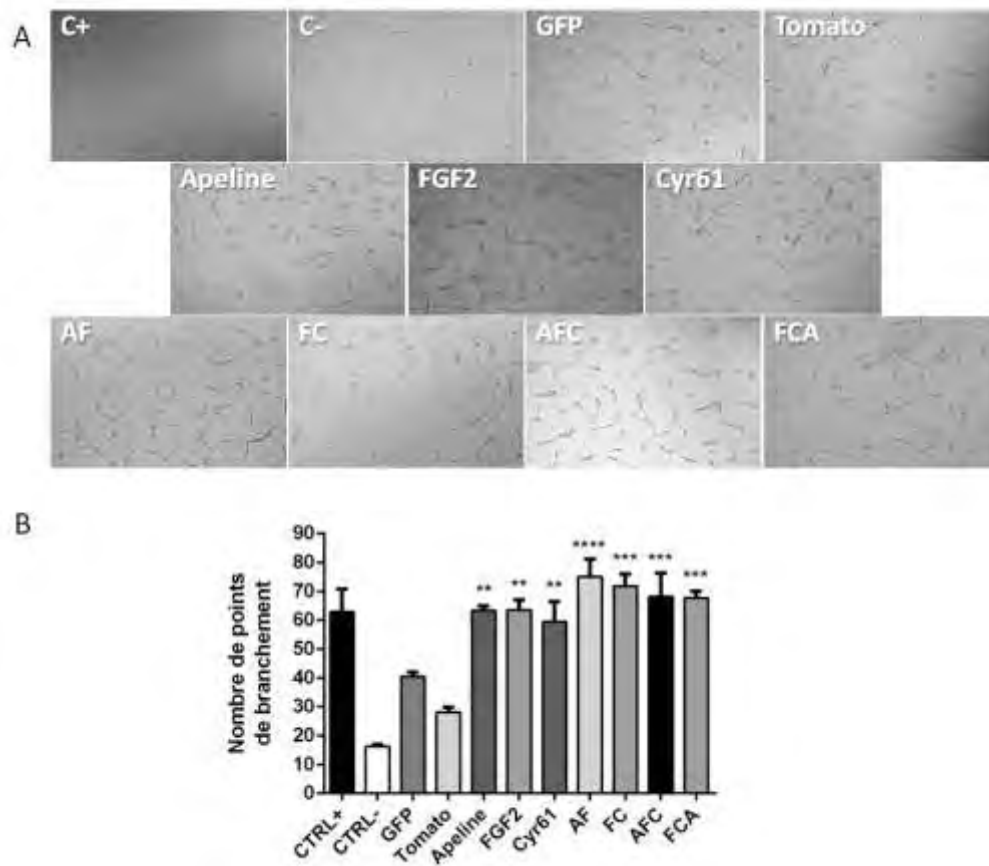


Figure 7 : Analyse de l'effet pro-angiogénique des CSM transduites par différentes combinaisons.

Les CSM ont été transduites par les différentes constructions et le milieu conditionné a été utilisé pour cultiver des HUVEC (cellules endothéliales de veines ombilicales humaines) sur du Matrigel (A).

Après 8h, l'angiogenèse a été évaluée par quantification des points de branchement (B).

CTRL+ : contrôle positif ; CTRL- : contrôle négatif ; GFP : green fluorescent protein ; AF : apeline-FGF2 ; FC : FGF2-Cyr61 ; AFC : apeline-FGF2-Cyr61 ; FCA : FGF2-Cyr61-apeline. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (n=3 puits par groupe, 5 photos par puits). **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001 vs Tomato.

Nos résultats mettent en évidence que la formation de tubules est significativement plus élevée en présence de milieux conditionnés de CSM transduites avec les lentivecteurs contenant les gènes angiogéniques par rapport aux milieux conditionnés des CSM transduites avec les lentivecteurs contrôles GFP ou Tomato (Figure 7B). Tous les lentivecteurs thérapeutiques ayant un pouvoir angiogénique proche de celui du contrôle positif, nous n'avons pas pu identifier de différence significative selon les combinaisons. Cependant les vecteurs bi- et tricistroniques tendent à favoriser la tubulogenèse plus efficacement que les monocistroniques. En se référant aux résultats obtenus avec les HL-1 et des expériences antérieures réalisées au laboratoire, on s'attend à ce que les transgènes

multicistroniques soient moins exprimés que les monocistroniques (A. C. Prats *et al.*, 2013; Rayssac *et al.*, 2009). De ce fait, leur activité angiogénique légèrement supérieure à celle des monocistroniques pourrait devenir très significativement supérieure une fois ramenée à la quantité de messenger exprimé. L'expression des lentivecteurs devra être mesurée par RT-qPCR afin de vérifier cette hypothèse.

Conclusion et discussion

Les résultats de quantification d'ARNm obtenus à partir des cellules HL-1 révèlent une différence d'expression en fonction de la cassette. Comme il a déjà été démontré (Rayssac *et al.*, 2009), les vecteurs monocistroniques s'expriment plus fortement que les vecteurs multicistroniques. De façon surprenante néanmoins, le vecteur porteur de la cassette FGF2-Cyr61-apeline s'exprime très fortement alors qu'un changement de l'ordre des cistrons, avec la cassette apeline-FGF2-Cyr61, a une forte influence sur l'expression du transgène. Il est possible que les ARNm transcrits à partir de ces cassettes n'aient pas la même stabilité.

Les expériences de tubulogenèse à partir de cardiomyocytes HL-1 indiquent que la construction tricistronique apeline-FGF2-Cyr61 est la plus efficace pour induire un effet pro-angiogénique de façon paracrine, et ce à plus faible dose. Sachant qu'une quantité importante de facteur angiogénique peut favoriser la croissance tumorale (Rayssac *et al.*, 2009), cette combinaison paraît très avantageuse. De plus, malgré une forte expression du vecteur FGF2-Cyr61-apeline, son pouvoir pro-angiogénique est nettement plus faible que celui du vecteur apeline-FGF2-Cyr61. Sachant que le premier cistron sous le contrôle de la coiffe est généralement plus traduit que le deuxième cistron sous le contrôle de l'IRES, sans condition de stress, ces deux vecteurs ne présentent sans doute pas les mêmes proportions entre les molécules pro-angiogéniques. Pour confirmer cette hypothèse, nous analyserons par la suite la quantité des protéines sécrétées dans le milieu. Ces résultats révèlent néanmoins l'importance d'étudier différents ratios de facteurs angiogéniques pour optimiser l'action sur la revascularisation post-ischémique. Si cela est confirmé, l'utilisation de vecteurs basés sur les IRES serait bien plus favorable que les systèmes permettant un ratio 1:1 entre deux molécules, comme le peptide 2A.

Nos analyses de cytométrie en flux permettent de confirmer que nous avons isolé en culture des CSM de rat issues de la moelle osseuse. Etant donné que les CSM sont les seules cellules à adhérer au plastique, les changements de milieu et les passages nous permettent d'isoler les cellules désirées mais la population de cellules hématopoïétiques est encore trop

importante au troisième passage pour pouvoir affirmer que les résultats obtenus par la suite dépendent uniquement des CSM. En effet, dans la littérature, les chercheurs ont mis en évidence que les CSM expriment les marqueurs CD90 et CD29 avec un pourcentage qui doit être supérieur à 80% mais n'expriment pas CD45 avec un pourcentage qui doit être inférieur à 2% (Boxall et Jones, 2012; Pittenger *et al.*, 1999). Il est possible qu'un passage supplémentaire soit suffisant pour obtenir une pureté acceptable, ce que nous étudierons par la suite. Si la pureté est malgré tout difficile à obtenir, on pourra éventuellement trier les CSM par cytométrie en flux.

Par la suite, nous avons été capables de transduire très efficacement les CSM. Nous avons validé l'utilisation de lentivecteurs à IRES dans ces cellules et mis en évidence une différence d'activité entre les IRES. Cependant, sachant que les CSM injectées dans le cœur ischémique seront en condition de stress hypoxique, il serait intéressant de mesurer l'activité des IRES dans les CSM soumises à l'hypoxie. En effet, nous avons démontré précédemment que les IRES testés, excepté l'IRES d'EMCV, sont activés par l'hypoxie dans les cardiomyocytes HL-1 ou dans d'autres types cellulaires ou tissus (Bornes *et al.*, 2007; Conte *et al.*, 2008; Morfoisse *et al.*, 2014) (Hantelys et coll., en préparation). Nous pourrions, suite à ces résultats, sélectionner l'IRES optimal pour l'expression de vecteurs multicistroniques dans les CSM, et éventuellement concevoir les mêmes vecteurs thérapeutiques avec un IRES différent de celui de FGF1 actuellement utilisé.

Enfin, les résultats obtenus à partir des CSM transduites révèlent le pouvoir angiogénique de tous les lentivecteurs thérapeutiques, sans différence significative entre eux. Néanmoins, la combinaison de plusieurs molécules semble favoriser la tubulogenèse. On remarque par ailleurs que les niveaux de tubules des puits contenant le milieu conditionné des CSM transduites par des lentivecteurs pro-angiogéniques sont similaires à celui du contrôle positif. Il est probable que la forte expression des transgènes associée à la production endogène de facteurs angiogéniques par les CSM génère un effet trop important sur la tubulogenèse et que par conséquent les différences entre les constructions ne puissent être visibles. Pour affiner les résultats, nous referons cette expérience en diluant les milieux conditionnés, et en analysant la tubulogenèse à des temps plus courts.

Matériels et méthodes

Préparation des cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses ont été isolées à partir de la moelle osseuse de fémur de rats Lewis. Les rats Lewis de 8 semaines d'un poids de 250 g environ ont été anesthésiés avec 40 mg/kg de Kétamine et 2% de Xylazine. Les fémurs ont été prélevés puis "flushés" avec du milieu α -MEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 1% de Pénicilline/Streptomycine. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 1200 tours par minute puis resuspendues dans 30 mL de milieu complet. Elles ont ensuite étéensemencées à 200 000 cellules/cm² dans des flasques T75. Après 24 heures le milieu a été changé, puis chaque jour pendant 7 jours après un lavage PBS (Phosphate Buffered Saline). Les cellules sont maintenues en atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO₂.

Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses par cytométrie en flux

2,5.10⁵ cellules ont été multi-marquées pendant 1 heure à 4°C avec les différents anticorps (tableau I). Des cellules couplées aux isotypes contrôles (IgG1) de chaque fluorochrome ainsi que des cellules non marquées ont été utilisées comme contrôles. Parallèlement des billes de compensations (Compbead anti-mouse IgK/Negative, Ref : 552843, BD Bioscience) ont été marquées séparément avec les anticorps, afin de calculer les compensations entre les fluorochromes. Les cellules et les billes ont ensuite été analysées à l'aide du cytomètre BD Fortessa (BDBiosciences), avec le logiciel DIVA (BDBiosciences).

Anticorps	Fluorochrome	Concentration	Référence
CD29	FITC	2,2µg/µL	Ozyme : BLE102205
CD90	BV421	0,65µg/µL	BD: 563770
CD45	PE-Cy TM 7	0,9µg/µL	BD: 561588
CD34	PE	0,43µg/µL	Acris : AM20322RP-S

Tableau I : Anticorps utilisés pour caractériser les CSM

Production des lentivecteurs

Les lentivecteurs ont été produits et titrés comme décrit précédemment (Chapitre 3).

Transduction des cellules souches mésenchymateuses

Les CSM ont étéensemencées à raison de 200 000 cellules par puits de 962 mm². Le lendemain, le lentivecteur GFP a été dilué ou non dans du milieu OptiMEM (2.10⁶ TU/mL, 1.10⁶ TU/mL, 5.10⁵ TU/mL) en présence ou non de protamine sulfate (0 µg/mL, 5 µg/mL ou 10 µg/mL) dans un volume final de 1 mL. Après une incubation de 16 heures à 37°C et 5% de

CO₂, le milieu de transduction est remplacé par du milieu de culture. Au bout de 72 heures, les cellules transduites ont été fixées avec de la formaline 10% et le pourcentage de cellules transduites a été mesuré par FACS.

Les lentivecteurs pro-angiogéniques ont quant à eux ont été dilués au 1/4 (à 5.10⁵ TU/mL) dans du milieu OptiMEM. Après une incubation de 16 heures à 37°C et 5% de CO₂, le milieu de transduction est remplacé par du milieu de culture. Au bout de 48 heures, le milieu est remplacé par de l'OptiMEM pour être récolté 24 heures plus tard. Les milieux conditionnés ont été stockés à -80°C pour réaliser ultérieurement les expériences de tubulogénèse.

Test d'activité de l'IRES par luminescence (kit dual luciferase reporter assay system de Promega)

Les CSM ont été transduites (comme décrit précédemment) par des lentivecteurs bicistroniques "Lucky-Luke" pCMV-LucR-IRES-LucF portant des IRES de différents facteurs angiogéniques et lymphangiogéniques (FGF1, FGF2, VEGFAa, VEGFAb, VEGFC, VEGFD), ainsi qu'un IRES d'origine virale (EMCV). 48 heures après transduction, les CSM ont été lysées avec le tampon de lyse "neutre" du kit puis elles ont été grattées et récupérées sur glace. Dans une plaque 96 puits opaque, les échantillons contenant les protéines ont été répartis en triplicat. Le substrat luciférase firefly a été injecté et la luminescence a été mesurée, puis le substrat luciférase renilla a été injecté à son tour et la luminescence mesurée. Enfin, l'activité de l'IRES a été calculée en faisant le ratio de LucF/LucR.

Culture et transduction des cardiomyocytes HL-1

Les cardiomyocytes HL-1 sont cultivés dans des flasques T75 (Corning, CellBIND), préalablement précotées avec de la gélatine et de la fibronectine de plasma bovin et en présence de milieu Claycomb (Sigma Aldrich). Pour la transduction, les cellules sont ensemencées à 30% de confluence dans des puits d'une plaque six puits. Les cellules sont ensuite transduites 24 heures après, par différents lentivecteurs, à 1.10⁶ TU/mL dans de l'OptiMEM avec 5µg/mL de protamine sulfate. Après une incubation de 16 heures à 37°C et 5% de CO₂, le milieu de transduction est remplacé par du milieu de culture. Au bout de 48 heures, le milieu est remplacé par de l'OptiMEM pour être récolté 24 heures plus tard. Les milieux conditionnés ont été stockés à -80°C pour réaliser ultérieurement les expériences de tubulogénèse.

Extraction d'ARN à partir de cardiomyocytes HL-1

Les cellules sont lysées avec du Trizol (Life Technologies), puis du chloroforme (1/5 du volume de Trizol) est ajouté. Après centrifugation, le surnageant contenant les ARN est récupéré. De l'isopropanol (1/2 du volume de Trizol) est ajouté, puis une autre

centrifugation est effectuée afin de culoter les ARN. Deux étapes de lavage sont ensuite réalisées avec de l'éthanol 75%, puis les culots sont resuspendus dans de l'eau « RNase free ».

RT-qPCR

A partir de 1µg d'ARN préalablement extraits de cardiomyocytes HL-1, une reverse transcription est effectuée à l'aide du kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription » (Applied Biosystems, Life Technologies). La qPCR nécessite l'utilisation des ADNc dilués au 1/10. Le mix Sso Fast Eva Green (BioRad) contenant les oligonucléotides et l'ADN polymérase est ajouté dans une plaque de 96 puits (Applied Biosystems, Life Technologies), ainsi que les amorces spécifiques aux gènes d'intérêts à amplifier ou au gène de référence (HPRT). L'amplification se fait à l'aide d'un thermocycleur StepOne. Les couples d'amorces utilisés sont les suivants : HPRT sens : 5'-TGGCCATCTGCCTAGTAAAGC-3', HPRT anti-sens : 5'-GGACGCAGCAACTGACATTTTC-3' ; apeline sens : 5'-GTTTGTGGAGTGCCACTG-3', apeline anti-sens : 5'-CGAAGTTCTGGGCTTCAC-3' ; FGF2 sens : 5'-TGGTATGTGGCACTGAAACGA-3', FGF2 anti-sens : 5'-GCCCAGGTCCTGTTTTGGAT-3'. Les ARNm ont été normalisés à partir du gène de référence HPRT et par comparaison avec les ARNm issus des cellules non transduites.

Tubulogenèse

Dans une plaque 24 puits, du Matrigel a préalablement été ajouté puis incubé à 37°C pendant 45 minutes afin qu'il puisse polymériser. Ensuite les HUVEC, cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical, ont étéensemencées à raison de 5.10^4 cellules par puits en présence d'OptiMEM-Glutamax dilué au 1/2 avec du milieu à 5% de sérum pour les contrôles positifs, d'OptiMEM-Glutamax dilué au 1/2 avec du milieu à 0,5% de sérum pour les contrôles négatifs ou en présence des milieux conditionnés des cardiomyocytes HL-1 ou CSM transduits dilué au 1/2 avec du milieu HUVEC à 0,5% de sérum. Les cellules sur Matrigel ont été incubées à 37°C pendant 8 heures (pour les CSM), et 24 heures (pour les cellules HL-1). Puis des photos de chaque puits ont été réalisées et analysées avec le logiciel ImageJ par comptage du nombre de tubes formés.

Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été réalisées à partir du logiciel GraphPad Prism. Le test de Student ou ANOVA one-way ont été utilisés.

Discussion

Ce travail de thèse aura contribué d'une part à élucider un mécanisme de régulation de l'expression génique permettant à la cellule de répondre à des conditions de stress, et d'autre part à développer des vecteurs multicistroniques de transfert de gènes thérapeutiques pour la thérapie génique de l'ischémie du membre et de l'ischémie myocardique, ouvrant des perspectives prometteuses pour une phase clinique à venir.

Le lentivecteur, un outil prometteur pour le transfert de gènes dans le muscle cardiaque

L'utilisation de lentivecteurs en injection intracardiaque constitue un des aspects originaux de ce travail, qui suscite cependant une discussion quant à l'efficacité du transfert de gène dans le cœur avec un tel vecteur. L'efficacité du transfert de gènes est l'un des points les plus souvent discutés face aux échecs des essais cliniques de phase avancée de thérapie génique. Pour la thérapie génique de l'insuffisance cardiaque, bien que la plupart des études utilisent les plasmides, les vecteurs adénoviraux ou les AAV, nous avons fait le choix des lentivecteurs pour plusieurs raisons. Le lentivecteur *sin* (self-inactivating) a été sélectionné pour sa sûreté et sa capacité à induire une expression à long terme dans le cœur (Kumar et Woon-Khiong, 2011; Niwano *et al.*, 2008). Niwano et coll. ont montré un bénéfice thérapeutique d'un lentivecteur exprimant SERCA2a pour traiter l'insuffisance cardiaque chez le rat. Une autre étude a utilisé avec succès les lentivecteurs pour reprogrammer *in situ* des fibroblastes cardiaques en cardiomyocytes par surexpression de facteurs de transcription (Mathison *et al.*, 2014). De plus, une étude récente a comparé le transfert de gènes dans le cœur à partir d'un vecteur adénoviral, d'un AAV et d'un lentivecteur chez la souris (Merentie *et al.*, 2016). Bien que l'efficacité de transduction soit plus faible avec un lentivecteur, l'AAV et le lentivecteur génèrent moins d'inflammation que le vecteur adénoviral.

En ce qui concerne l'utilisation d'un AAV en phase clinique, les récents problèmes rencontrés avec l'essai clinique utilisant un AAV exprimant SERCA2a indiquent que ce vecteur n'est pas optimal. Même si la raison la plus probable de cet échec est l'inefficacité de l'administration du vecteur par injection intracoronaire, il n'est pas exclu que cette inefficacité puisse être due à la présence d'anticorps contre ce vecteur à un niveau non détectable, ou à la stimulation d'une réponse immune suite à la transduction. La prévalence de ces anticorps neutralisants chez la moitié de la population pose en tous les cas un problème d'inclusion des patients dans les essais cliniques, puisque plus de la moitié des candidats ne sont pas éligibles à cause de leur titre d'anticorps. Il n'est également pas possible d'envisager une réadministration du vecteur puisque les patients développent des anticorps contre le

vecteur. Dans un tel contexte, notre étude valide l'utilisation des lentivecteurs pour la thérapie génique de l'insuffisance cardiaque.

Le lentivecteur possède la propriété de diffuser très peu dans le tissu après injection intramyocardique. L'inconvénient de ce vecteur est donc la limitation du potentiel de surexpression des facteurs sélectionnés, qui peut néanmoins être contourné par la production de facteurs sécrétés qui vont diffuser bien au-delà du site d'expression. Cette faible diffusion constitue un atout qui permet de réduire le risque d'effets indésirables. Pour pouvoir cibler une zone plus étendue dans le territoire à risque, il serait possible d'augmenter les sites d'injection mais cela multiplierait les dommages au tissu et le risque d'arythmies. Je pense qu'il serait bénéfique de développer des stratégies pour améliorer l'efficacité des lentivecteurs dans le cœur, car ils présentent des avantages que d'autres vecteurs n'ont pas, comme la faible réponse immuno-inflammatoire, la taille de la cassette ou encore l'intégration dans le génome qui permet une expression à long terme.

Perspectives de l'utilisation de vecteurs à IRES pour la thérapie génique combinée

Nos résultats indiquent une meilleure efficacité des vecteurs apeline-FGF2, apeline-FGF2-Serca2 et apeline-FGF2-Cyr61 comparés aux vecteurs monocistroniques correspondants. Ces résultats valident une fois de plus les vecteurs à IRES pour la thérapie combinée, à la suite de précédentes études du laboratoire dans le cas de l'ischémie du membre et de l'anti-angiogenèse anti-tumorale (A. C. Prats *et al.*, 2013; Rayssac *et al.*, 2009).

Plusieurs autres études ont démontré un bénéfice supérieur de la thérapie génique combinée par rapport à la surexpression d'un seul gène ((Renaud-Gabardos *et al.*, 2015), en annexe 1). Les vecteurs basés sur les IRES constituent l'outil le plus fréquemment utilisé pour co-exprimer plusieurs gènes d'intérêt, tandis que l'approche utilisant des peptides 2A a émergé (de Felipe 2006). Dans le domaine des maladies cardiovasculaires, le seul vecteur multicistronique utilisé en essai clinique est un plasmide exprimant VEGF et FGF2 séparé de l'IRES d'EMCV, qui a généré un bénéfice thérapeutique modéré sur la fonction cardiaque (Kukula *et al.*, 2011). L'effet limité peut être dû à une efficacité faible et transitoire du transfert de gène obtenu avec les plasmides ou au choix des molécules thérapeutiques. Cependant, une autre raison peut être l'utilisation de l'IRES d'EMCV présent dans la plupart des vecteurs basés sur les IRES publiés jusqu'à maintenant. En effet, l'IRES d'EMCV n'est pas activé dans les tissus ischémiques, contrairement aux IRES présents sur les ARNm de plusieurs facteurs angiogéniques (Conte *et al.*, 2008)(Bornes *et al.*, 2007; Morfisse *et al.*, 2014).

L'IRES de FGF1 a été sélectionné dans mes différents travaux car il a été démontré qu'il est actif dans le muscle et qu'il permet l'expression efficace de facteurs angiogéniques dans le modèle murin d'ischémie de la patte (Conte *et al.*, 2009; Rayssac *et al.*, 2009). Au cours de ma thèse, nous avons pu démontrer que l'IRES de FGF1 est activé lors de l'ischémie cardiaque (article 3) et par l'hypoxie dans les cardiomyocytes HL-1 (Hantelys et coll., en préparation) et les cardiomyoblastes H9C2 (travaux non publiés). Ces résultats suggèrent que l'IRES de FGF1 constitue un outil plus adéquat que l'IRES d'EMCV pour le transfert de gène dans des tissus ischémiques. Il paraît intéressant d'étudier également l'activité d'autres IRES dans le muscle squelettique et le myocarde ischémiques, car cela pourrait nous permettre d'optimiser l'expression de vecteurs multicistroniques dans les maladies cardiovasculaires ischémiques. De plus, l'activation des IRES par l'hypoxie est une caractéristique très importante pour limiter les effets indésirables de l'expression des gènes exogènes dans les zones saines. Ils permettent une expression modérée dans les zones non ischémiques, et une expression plus soutenue dans la zone d'intérêt. Les facteurs angiogéniques ou les facteurs agissant sur la contractilité des cardiomyocytes peuvent avoir un effet délétère s'ils sont exprimés dans des territoires sains ou à forte dose. Par exemple, la forte surexpression de Cyr61 dans le *tibialis anterior* est responsable d'une accélération de la progression tumorale (Rayssac *et al.*, 2009), tandis que le transfert du gène SERCA2a dans les myocytes atriaux *in vivo* induit des arythmies (Nassal *et al.*, 2015). Les IRES constituent donc un outil intéressant pour cibler l'expression des gènes exogènes.

Les facteurs régulateurs des IRES pour stimuler l'angiogenèse thérapeutique: une nouvelle piste thérapeutiques

Nous nous sommes également intéressés à la régulation et à l'activité de l'IRES de FGF1 au cours de la différenciation des myoblastes. Nous avons tout d'abord pu démontrer que l'activité de cet IRES, connue pour être augmentée au cours de la myogenèse (Conte *et al.*, 2009) est dépendante de son promoteur, et que le processus de régulation de la traduction est gouverné par deux ITAF p54^{nrb} et hnRNPM. Ces deux ITAF sont nécessaires à la différenciation des myoblastes en myotubes comme le démontrent clairement les expériences d'inhibition de l'expression de ces protéines. L'étude des ITAF p54^{nrb} et hnRNPM en condition de stress hypoxique pourrait fournir de nouvelles connaissances dans la régulation de l'expression génique au niveau traductionnel et en particulier sur le rôle des IRES dans les pathologies ischémiques. L'utilisation de la technologie du Biacore associé à la spectrométrie de masse (BIA-MS), en condition de stress hypoxique, pourrait nous permettre également d'identifier d'autres ITAF de l'IRES de FGF1 ou des ITAF d'autres IRES

activés par l'hypoxie et présents dans les ARNm de facteurs angiogéniques. Cette étude pourrait fournir de nouvelles pistes thérapeutiques pour stimuler l'angiogenèse dans les pathologies ischémiques.

La thérapie génique combinée pour l'angiogenèse thérapeutique pour réduire les effets indésirables et générer des vaisseaux plus fonctionnels

Dans le cas de l'angiogenèse thérapeutique, la thérapie combinée prend tout son sens dans la mesure où l'expression d'une combinaison de facteurs angiogéniques aboutira à la formation de vaisseaux plus fonctionnels (Chae *et al.*, 2000; Jazwa *et al.*, 2013; Kupatt *et al.*, 2010; Rayssac *et al.*, 2009).

Parmi les quatre candidats thérapeutiques sélectionnés pour la thérapie génique combinée dans mon projet de thèse, FGF2 a été utilisé plusieurs fois dans des études précliniques et cliniques de thérapie génique de l'insuffisance cardiaque ou de l'ischémie du membre inférieur (C. Heilmann *et al.*, 2002; C. A. Heilmann *et al.*, 2003; Iwatate *et al.*, 2001; J. S. Lee *et al.*, 2007b; Masaki *et al.*, 2002; Onimaru *et al.*, 2002; Rayssac *et al.*, 2009; Yonemitsu *et al.*, 2013). Les résultats sont prometteurs mais des essais cliniques incluant un grand nombre de patients sont nécessaires pour confirmer le potentiel du transfert de gène FGF2 dans les pathologies ischémiques. SERCA2a a également été souvent évalué mais la phase IIb de l'essai CUPID n'a pas permis de révéler un bénéfice thérapeutique significatif (Greenberg *et al.*, 2016; Yla-Herttuala, 2015). Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que le transfert d'un seul gène ne peut être efficace pour traiter une pathologie présentant des altérations à différents niveaux. Cyr61 a très peu été utilisé en thérapie génique des pathologies ischémiques (Fataccioli *et al.*, 2002; K. Meyer *et al.*, 2016; Rayssac *et al.*, 2009). L'effet pro-angiogénique de ce facteur a été démontré dans l'ischémie du membre inférieur. Il permet également de diminuer la fibrose dans le muscle cardiaque après constriction aortique transverse. Cyr61 présente un réel potentiel pour traiter ces pathologies, mais il faut cependant être vigilant quant à son niveau d'expression pour ne pas induire de croissance tumorale. Enfin, l'apeline est un candidat émergent dans le domaine de la thérapie génique des maladies cardiovasculaires. Ce facteur a été utilisé seulement par un groupe comme gène thérapeutique dans des modèles murins d'insuffisance cardiaque (Li2013, zeng2014). Le traitement avec des cellules de la moelle osseuse surexprimant l'apeline permet d'améliorer la réparation du myocarde après infarctus alors que le vecteur adénoviral injecté dans des souris diabétiques augmente la densité vasculaire et améliore la fonction cardiaque.

Dans notre modèle animal, la thérapie génique avec l'apeline seule permet de réduire l'hypertrophie et la fibrose cardiaque sans pour autant améliorer les paramètres échocardiographiques et l'angiogenèse, malgré le fait qu'elle soit angiogénique *in vitro*. Ces effets nuancés dans nos conditions peuvent venir d'une faible efficacité de transfert de gène et/ou de l'induction d'apeline endogène dans le cœur ischémique qui peut masquer l'effet de l'apeline exogène (Atluri *et al.*, 2007). Contrairement aux effets modérés du lentivecteur apeline, les lentivecteurs bi- et tricistronique apeline-FGF2 et apeline-FGF2-SERCA2a améliorent tous les paramètres testés comme la fraction d'éjection, la dilatation du ventricule gauche, l'hypertrophie, la fibrose et l'angiogenèse. L'ajout de SERCA2a à la combinaison apeline-FGF2 augmente légèrement le bénéfice thérapeutique. Cette faible différence est peut-être le résultat d'une expression modérée du gène SERCA2a situé en troisième cistron. De plus, il semble que les cellules transduites par les lentivecteurs sont principalement des cellules endothéliales. Le facteur SERCA2a n'étant pas sécrété, l'effet de sa surexpression sur la contractilité des cardiomyocytes est donc naturellement limité.

L'effet le plus frappant est la coopération de l'apeline avec FGF2 malgré une plus faible expression du vecteur bicistronique comparé au vecteur monocistronique. Cette observation est en accord avec les études combinant les facteurs angiogéniques FGF2 et Cyr61 pour traiter l'ischémie du membre (Rayssac *et al.*, 2009). Les données que j'ai obtenues sur l'insuffisance cardiaque confirment que les vecteurs multicistroniques génèrent des bénéfices supérieurs à plus faibles doses de molécules thérapeutiques. Cette caractéristique est très intéressante puisque cela diminue le risque d'effets secondaires.

Les limites des modèles animaux

Une des limites des travaux sur l'insuffisance cardiaque et l'ischémie du membre inférieur chez l'animal est liée au modèle lui-même. Chez l'homme, ces pathologies sont généralement accompagnées d'autres problèmes de santé, tels que l'hypercholestérolémie ou le diabète. Les patients sont parfois fumeurs, ou suivent des traitements cardioactifs. Tous ces paramètres ont un impact négatif sur la réponse à l'angiogenèse (Cochain *et al.*, 2013; Kutryk *et al.*, 2001). L'essai BONAMI a démontré par exemple que les patients non fumeurs bénéficient d'une meilleure viabilité du myocarde suite à l'injection de cellules de la moelle osseuse comparé aux patients fumeurs (Roncalli *et al.*, 2011). Même s'il est possible de travailler sur des souris diabétiques et/ou âgées par exemple, les patients souffrant d'une maladie cardiovasculaire présentent une telle hétérogénéité concernant leur état de santé qu'on ne peut imaginer disposer d'un modèle animal présentant les mêmes caractéristiques. L'angiogenèse thérapeutique peut s'avérer efficace dans un certain modèle d'ischémie

comme cela peut ne pas être le cas dans un autre fond génétique ou suivant le régime de l'animal ou l'âge. C'est probablement en partie pour ces raisons que les bénéfices de la thérapie angiogénique obtenus dans les études précliniques ne sont pas confirmés chez l'homme.

- **Les modèles d'ischémie de la patte**

Face aux limites imposées par l'animal, il peut s'avérer utile d'étudier les effets des traitements pro-angiogéniques dans différents modèles pour mieux déterminer les patients qui pourront tirer profit d'une telle thérapie. Un des projets de ma thèse a été de comparer le pouvoir pro-angiogénique du vecteur exprimant FGF2-Cyr61 dans deux fonds génétiques différents : des souris BALB/c connues pour leur sensibilité à l'ischémie et des souris C57BL/6 hypercholestérolémiques. Suite à cette étude, nous avons pu confirmer les résultats obtenus par Rayssac et coll. (2009).

Le modèle chirurgical de l'ischémie chez l'animal est également une limite des travaux sur ce type de pathologies. En effet, que ce soit la ligature-exérèse de l'ensemble de l'artère fémorale ou la ligature définitive de l'artère coronaire descendante gauche, il s'agit d'une chirurgie aiguë ce qui n'est généralement pas le cas chez l'homme pour lequel le processus d'athérosclérose est progressif et peut mener à une occlusion aiguë pour certains patients.

La variabilité des résultats des essais cliniques d'angiogenèse thérapeutique peut venir de l'environnement tissulaire et du niveau de sévérité de la maladie. Les effets des facteurs thérapeutiques peuvent en effet différer selon l'état du tissu, en présence d'athérosclérose diffuse, ou de dysfonction endothéliale. Dans le cas de l'ischémie du membre inférieur, les patients avec une ischémie sévère (stade IV de la classification de Fontaine) sont déjà plus réfractaires à une telle stratégie de revascularisation (Silvestre *et al.*, 2013). De même, le micro-environnement cardiaque d'un patient ayant subi un infarctus aigu n'est pas le même que celui d'un patient en insuffisance cardiaque avancé. L'étude BONAMI a par exemple mis en évidence une tendance à l'amélioration de la viabilité du myocarde chez les patients avec une obstruction microvasculaire après injection de cellules mononucléaires de la moelle osseuse (Roncalli *et al.*, 2011).

Les résultats inattendus de l'effet délétère de la surexpression de facteurs angiogéniques avant chirurgie dans notre étude sur l'ischémie du membre inférieur, nous ont permis de mettre en évidence l'importance de traiter les patients en fonction du stade la pathologie. La surexpression de facteurs pro-angiogéniques dans un environnement sain peut être sans conséquence comme cela a été observé après injection du plasmide FGF2-Cyr61 dans la

patte non ischémique (Rayssac *et al.*, 2009) ou totalement délétère si l'ischémie survient après comme cela a été démontré lorsque l'AAV exprimant FGF2-Cyr61 a été injecté 28 ou 21 jours avant chirurgie (article 2). Ces résultats renforcent l'idée que l'effet des traitements pro-angiogéniques peut dépendre de l'état du patient.

- **Les modèles d'ischémie cardiaque**

Dans notre étude sur la thérapie génique de l'ischémie cardiaque, les lentivecteurs ont été injectés au moment de la ligature d'une branche de l'artère coronaire gauche. Pour que notre modèle se rapproche de la prise en charge des patients en insuffisance cardiaque, il aurait été plus intéressant d'étudier l'effet des vecteurs en les injectant plusieurs semaines après, lorsque l'animal présente les caractéristiques d'une insuffisance cardiaque. Cela n'a pas pu être possible pour des raisons techniques, comme il est difficile de réaliser une nouvelle intervention après une thoracotomie. Nous pouvons cependant nous interroger sur le potentiel d'une thérapie angiogénique à un stade avancé d'insuffisance cardiaque. En effet, la stimulation de l'angiogenèse peut permettre de réduire la mort des cardiomyocytes mais une fois que le territoire n'est plus viable, les dommages dans cette zone sont probablement irréversibles. L'angiogenèse thérapeutique à un stade avancé aurait peut-être un pouvoir limité en empêchant la progression de l'insuffisance cardiaque mais elle ne permettra pas de récupérer la totalité de la fonction cardiaque. Il serait cependant intéressant d'associer la thérapie angiogénique avec la stimulation de la régénération des cardiomyocytes.

Toutes ces données démontrent l'importance d'adapter la revascularisation thérapeutique en fonction du micro-environnement, du stade de la maladie ischémique et de l'état de santé global du patient.

En perspective de mes travaux sur la thérapie génique de l'insuffisance cardiaque chez la souris, nous cherchons à mettre au point l'injection de lentivecteurs sans thoracotomie en utilisant l'échographe VEVO 2100 dans un modèle de rat. Les objectifs seraient de confirmer les effets angiogéniques et cardioprotecteurs précédemment obtenus dans un autre modèle animal et d'étudier le potentiel des vecteurs sur le traitement de l'insuffisance cardiaque à un stade avancé.

La thérapie génique ex vivo à partir de cellules souches de la moelle osseuse génétiquement modifiées.

Nous avons initié également un projet de thérapie génique *ex vivo* en modifiant génétiquement des cellules souches mésenchymateuses. Nous souhaitons étudier le potentiel thérapeutique de CSM préalablement transduites par des lentivecteurs mono-, bi- ou tricistroniques exprimant apeline, FGF2 et/ou Cyr61, administrées sous échocardiographie par injection intramyocardique chez le rat souffrant d'insuffisance cardiaque. Le bénéfice thérapeutique sur l'ensemble des fonctions cardiaques pourra être ainsi mesuré par quantification de l'angiogenèse, de la fibrose et par évaluation de la morphologie cardiaque. Ce travail pourra également être transposé sur un modèle d'ischémie critique du membre inférieur.

Afin d'augmenter la survie cellulaire des CSM et d'augmenter la concentration de cellules thérapeutiques au niveau du site d'ischémie, une collaboration avec le CIRIMAT (centre interuniversitaire de recherche et d'ingénierie des matériaux) et l'équipe du Dr Angelo Parini a été créée afin de mettre au point des patchs 3D à base d'alginate et de chitosane. L'objectif est d'étudier la survie et les effets paracrines des CSM modifiées génétiquement avec le lentivecteur FGF2-Cyr61 etensemencées dans ces patchs pour traiter l'insuffisance cardiaque ischémique ((Ceccaldi *et al.*, 2014), collaboration avec Raya Bushkalova).

De plus, Guijarro et ses collaborateurs ont mis en évidence, dans une thérapie cellulaire clinique de phase 1 que les CSM peuvent être administrées en toute sécurité dans le cœur des patients souffrant d'ischémie du myocarde et peuvent être associées à l'amélioration des performances cardiaques et de l'état fonctionnel des patients (Guijarro *et al.*, 2016). De ce fait, lorsque la meilleure combinaison de lentivecteurs multicistroniques sera déterminée chez le rat en insuffisance cardiaque, la perspective finale de ce projet sera d'élaborer un essai clinique de thérapie génique angiogénique combiné à une thérapie cellulaire chez le patient atteint d'insuffisance cardiaque, en collaboration avec les cliniciens du CHU de Rangueil à Toulouse. Ainsi, cette nouvelle stratégie thérapeutique représenterait une avancée majeure dans le traitement de l'ischémie cardiaque.

Bibliographie

- Abdel-Latif, A., Bolli, R., Tleyjeh, I.M., Montori, V.M., Perin, E.C., Hornung, C.A., Zuba-Surma, E.K., Al-Mallah, M., and Dawn, B. (2007). Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 167, 989-997.
- Adams, J.E., 3rd, Bodor, G.S., Davila-Roman, V.G., Delmez, J.A., Apple, F.S., Ladenson, J.H., and Jaffe, A.S. (1993). Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 88, 101-106.
- Adams, R.H., and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 464-478.
- Ai, M., Yan, C.F., Xia, F.C., Zhou, S.L., He, J., and Li, C.P. (2016). Safety and efficacy of cell-based therapy on critical limb ischemia: A meta-analysis. *Cytotherapy* 18, 712-724.
- Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S.Y., Elroy-Stein, O., and Levi, B.Z. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 17, 227-236.
- Al-Khaldi, A., Al-Sabti, H., Galipeau, J., and Lachapelle, K. (2003). Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg* 75, 204-209.
- Allera-Moreau, C., Chomarat, P., Audinot, V., Coge, F., Gillard, M., Martineau, Y., Boutin, J.A., and Prats, A.C. (2006). The use of IRES-based bicistronic vectors allows the stable expression of recombinant G-protein coupled receptors such as NPY5 and histamine 4. *Biochimie* 88, 737-746.
- Allera-Moreau, C., Delluc-Clavieres, A., Castano, C., Van den Berghe, L., Golzio, M., Moreau, M., Teissie, J., Arnal, J.F., and Prats, A.C. (2007). Long term expression of bicistronic vector driven by the FGF-1 IRES in mouse muscle. *BMC Biotechnol* 7, 74.
- Annex, B.H. (2013). Therapeutic angiogenesis for critical limb ischaemia. *Nat Rev Cardiol* 10, 387-396.
- Apolonia, L., Waddington, S.N., Fernandes, C., Ward, N.J., Bouma, G., Blundell, M.P., Thrasher, A.J., Collins, M.K., and Philpott, N.J. (2007). Stable gene transfer to muscle using non-integrating lentiviral vectors. *Mol Ther* 15, 1947-1954.
- Arguelles, S., Camandola, S., Cutler, R.G., Ayala, A., and Mattson, M.P. (2014). Elongation factor 2 diphthamide is critical for translation of two IRES-dependent protein targets, XIAP and FGF2, under oxidative stress conditions. *Free Radic Biol Med* 67, 131-138.
- Arguero, R., Careaga-Reyna, G., Castano-Guerra, R., Garrido-Garduno, M.H., Magana-Serrano, J.A., and de Jesus Nambo-Lucio, M. (2006). Cellular autotransplantation for ischemic and idiopathic dilated cardiomyopathy. Preliminary report. *Arch Med Res* 37, 1010-1014.
- Arnaud, E., Touriol, C., Boutonnet, C., Gensac, M.C., Vagner, S., Prats, H., and Prats, A.C. (1999). A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol* 19, 505-514.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J.M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.

- Ashley, E.A., Powers, J., Chen, M., Kundu, R., Finsterbach, T., Caffarelli, A., Deng, A., Eichhorn, J., Mahajan, R., Agrawal, R., *et al.* (2005). The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 65, 73-82.
- Assmus, B., Leistner, D.M., Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Sedding, D., Yu, J., Corti, R., *et al.* (2014). Long-term clinical outcome after intracoronary application of bone marrow-derived mononuclear cells for acute myocardial infarction: migratory capacity of administered cells determines event-free survival. *Eur Heart J* 35, 1275-1283.
- Assomull, R.G., Prasad, S.K., Lyne, J., Smith, G., Burman, E.D., Khan, M., Sheppard, M.N., Poole-Wilson, P.A., and Pennell, D.J. (2006). Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 48, 1977-1985.
- Atluri, P., Morine, K.J., Liao, G.P., Panlilio, C.M., Berry, M.F., Hsu, V.M., Hiesinger, W., Cohen, J.E., and Joseph Woo, Y. (2007). Ischemic heart failure enhances endogenous myocardial apelin and APJ receptor expression. *Cell Mol Biol Lett* 12, 127-138.
- Audigier, S., Guiramand, J., Prado-Lourenco, L., Conte, C., Gonzalez-Herrera, I.G., Cohen-Solal, C., Recasens, M., and Prats, A.C. (2008). Potent activation of FGF-2 IRES-dependent mechanism of translation during brain development. *RNA* 14, 1852-1864.
- Azzouz, M., Martin-Rendon, E., Barber, R.D., Mitrophanous, K.A., Carter, E.E., Rohll, J.B., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J., and Mazarakis, N.D. (2002). Multicistronic lentiviral vector-mediated striatal gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and GTP cyclohydrolase I induces sustained transgene expression, dopamine production, and functional improvement in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22, 10302-10312.
- Babic, A.M., Kireeva, M.L., Kolesnikova, T.V., and Lau, L.F. (1998). CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6355-6360.
- Bacourt F, F.D., Mignon E (2002). Athérosclérose oblitérante des membres inférieurs. *Encycl Méd Chir. Angéiologie* p:19-1510.
- Baffour, R., Berman, J., Garb, J.L., Rhee, S.W., Kaufman, J., and Friedmann, P. (1992). Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 16, 181-191.
- Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25, 1384-1392.
- Barnes, G., Japp, A.G., and Newby, D.E. (2010). Translational promise of the apelin-APJ system. *Heart* 96, 1011-1016.
- Barnes, G.D., Alam, S., Carter, G., Pedersen, C.M., Lee, K.M., Hubbard, T.J., Veitch, S., Jeong, H., White, A., Cruden, N.L., *et al.* (2013). Sustained cardiovascular actions of APJ agonism during renin-angiotensin system activation and in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 6, 482-491.
- Barry, S.P., Davidson, S.M., and Townsend, P.A. (2008). Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2023-2039.
- Battler, A., Scheinowitz, M., Bor, A., Hasdai, D., Vered, Z., Di Segni, E., Varda-Bloom, N., Nass, D., Engelberg, S., Eldar, M., *et al.* (1993). Intracoronary injection of basic fibroblast

- growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *J Am Coll Cardiol* 22, 2001-2006.
- Bauersachs, J., Galuppo, P., Fraccarollo, D., Christ, M., and Ertl, G. (2001). Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 104, 982-985.
- Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K., and Isner, J.M. (1998). Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97, 1114-1123.
- Becker, F., and Loppinet, A. (2007). [Chronic critical ischemia of the legs. Definition and management]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 56, 63-69.
- Beerli, R., Chaput, M., Guerrero, J.L., Kawase, Y., Yosefy, C., Abedat, S., Karakikes, I., Morel, C., Tisovsky, A., Sullivan, S., *et al.* (2010). Gene delivery of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase inhibits ventricular remodeling in ischemic mitral regurgitation. *Circ Heart Fail* 3, 627-634.
- Belch, J., Hiatt, W.R., Baumgartner, I., Driver, I.V., Nikol, S., Norgren, L., Van Belle, E., Committees, T., and Investigators (2011). Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet* 377, 1929-1937.
- Belch, J.J., Bridges, A.B., Scott, N., and Chopra, M. (1991). Oxygen free radicals and congestive heart failure. *Br Heart J* 65, 245-248.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., *et al.* (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., *et al.* (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98-102.
- Berlitz, C., and Darlix, J.L. (1995). An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *J Virol* 69, 2214-2222.
- Berlitz, C., Torrent, C., and Darlix, J.L. (1995). An internal ribosomal entry signal in the rat VL30 region of the Harvey murine sarcoma virus leader and its use in dicistronic retroviral vectors. *J Virol* 69, 6400-6407.
- Bernstein, J., Sella, O., Le, S.Y., and Elroy-Stein, O. (1997). PDGF2/c-sis mRNA leader contains a differentiation-linked internal ribosomal entry site (D-IRES). *J Biol Chem* 272, 9356-9362.
- Berry, M.F., Piroli, T.J., Jayasankar, V., Burdick, J., Morine, K.J., Gardner, T.J., and Woo, Y.J. (2004). Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 110, 1187-1193.
- Bigger, B.W., Tolmachov, O., Collombet, J.M., Fragkos, M., Palaszewski, I., and Coutelle, C. (2001). An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J Biol Chem* 276, 23018-23027.
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., and Rifkin, D.B. (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 18, 26-45.
- Billinger, M., Kloos, P., Eberli, F.R., Windecker, S., Meier, B., and Seiler, C. (2002). Physiologically assessed coronary collateral flow and adverse cardiac ischemic events:

- a follow-up study in 403 patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 40, 1545-1550.
- Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., *et al.* (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.
- Boal, F., Roumegoux, J., Alfarano, C., Timotin, A., Calise, D., Anesia, R., Drougard, A., Knauf, C., Lagente, C., Roncalli, J., *et al.* (2015). Apelin regulates FoxO3 translocation to mediate cardioprotective responses to myocardial injury and obesity. *Sci Rep* 5, 16104.
- Bonnal, S., Pileur, F., Orsini, C., Parker, F., Pujol, F., Prats, A.C., and Vagner, S. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J Biol Chem* 280, 4144-4153.
- Bornes, S., Prado-Lourenco, L., Bastide, A., Zanibellato, C., Iacovoni, J.S., Lacazette, E., Prats, A.C., Touriol, C., and Prats, H. (2007). Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ Res* 100, 305-308.
- Bosch, M.K., Nerbonne, J.M., and Ornitz, D.M. (2014). Dual transgene expression in murine cerebellar Purkinje neurons by viral transduction in vivo. *PLoS One* 9, e104062.
- Bouchentouf, M., Forner, K.A., Cuerquis, J., Michaud, V., Zheng, J., Paradis, P., Schiffrin, E.L., and Galipeau, J. (2010). Induction of cardiac angiogenesis requires killer cell lectin-like receptor 1 and alpha4beta7 integrin expression by NK cells. *J Immunol* 185, 7014-7025.
- Boxall, S.A., and Jones, E. (2012). Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int* 2012, 975871.
- Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yee, H., Cangiarella, J., Arju, R., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2007). A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol Cell* 28, 501-512.
- Braunwald, E. (2013). Heart failure. *JACC Heart Fail* 1, 1-20.
- Brunner, A., Chinn, J., Neubauer, M., and Purchio, A.F. (1991). Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol* 10, 293-300.
- Bui, A.L., Horwich, T.B., and Fonarow, G.C. (2011). Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 8, 30-41.
- Burchfield, J.S., Xie, M., and Hill, J.A. (2013). Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation* 128, 388-400.
- Byrne, M.J., Power, J.M., Prevolos, A., Mariani, J.A., Hajjar, R.J., and Kaye, D.M. (2008). Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther* 15, 1550-1557.
- Cao, R., Brakenhielm, E., Pawliuk, R., Wariaro, D., Post, M.J., Wahlberg, E., Leboulch, P., and Cao, Y. (2003). Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 9, 604-613.
- Cao, R., Eriksson, A., Kubo, H., Alitalo, K., Cao, Y., and Thyberg, J. (2004). Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res* 94, 664-670.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., *et al.* (1996). Abnormal blood vessel

- development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., *et al.* (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7, 575-583.
- Carmeliet, P., Ng, Y.S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V.V., Stalmans, I., Mattot, V., *et al.* (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5, 495-502.
- Ceccaldi, C., Bushkalova, R., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Bourin, P., Frugier, C., Rouzaud-Laborde, C., Cussac, D., Parini, A., *et al.* (2014). Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. *Acta Biomater* 10, 901-911.
- Cenni, E., Perut, F., Granchi, D., Avnet, S., Amato, I., Brandi, M.L., Giunti, A., and Baldini, N. (2007). Inhibition of angiogenesis via FGF-2 blockage in primitive and bone metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 27, 315-319.
- Cepko, C.L., Roberts, B.E., and Mulligan, R.C. (1984). Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* 37, 1053-1062.
- Ceylan-Isik, A.F., Kandadi, M.R., Xu, X., Hua, Y., Chicco, A.J., Ren, J., and Nair, S. (2013). Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 63, 4-13.
- Chae, J.K., Kim, I., Lim, S.T., Chung, M.J., Kim, W.H., Kim, H.G., Ko, J.K., and Koh, G.Y. (2000). Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2573-2578.
- Chan, H.Y., V, S., Xing, X., Kraus, P., Yap, S.P., Ng, P., Lim, S.L., and Lufkin, T. (2011). Comparison of IRES and F2A-based locus-specific multicistronic expression in stable mouse lines. *PLoS One* 6, e28885.
- Chandrashekar, Y., Sen, S., Anway, R., Shuros, A., and Anand, I. (2004). Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 43, 295-301.
- Chicoine, L.G., Montgomery, C.L., Bremer, W.G., Shontz, K.M., Griffin, D.A., Heller, K.N., Lewis, S., Malik, V., Grose, W.E., Shilling, C.J., *et al.* (2014). Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on microdystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther* 22, 338-347.
- Chintala, H., Krupska, I., Yan, L., Lau, L., Grant, M., and Chaqour, B. (2015). The matricellular protein CCN1 controls retinal angiogenesis by targeting VEGF, Src homology 2 domain phosphatase-1 and Notch signaling. *Development* 142, 2364-2374.
- Chng, J., Wang, T., Nian, R., Lau, A., Hoi, K.M., Ho, S.C., Gagnon, P., Bi, X., and Yang, Y. (2015). Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *MAbs* 7, 403-412.
- Chun, H.J., Ali, Z.A., Kojima, Y., Kundu, R.K., Sheikh, A.Y., Agrawal, R., Zheng, L., Leeper, N.J., Pearl, N.E., Patterson, A.J., *et al.* (2008). Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J Clin Invest* 118, 3343-3354.
- Cochain, C., Channon, K.M., and Silvestre, J.S. (2013). Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxid Redox Signal* 18, 1100-1113.

- Coldwell, M.J., Mitchell, S.A., Stoneley, M., MacFarlane, M., and Willis, A.E. (2000). Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene* 19, 899-905.
- Comerota, A.J., Thom, R.C., Miller, K.A., Henry, T., Chronos, N., Laird, J., Sequeira, R., Kent, C.K., Bacchetta, M., Goldman, C., *et al.* (2002). Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg* 35, 930-936.
- Cong, B., Zhu, X., Cao, B., Xiao, J., Wang, Z., and Ni, X. (2013). Estrogens protect myocardium against ischemia/reperfusion insult by up-regulation of CRH receptor type 2 in female rats. *Int J Cardiol* 168, 4755-4760.
- Conte, C., Ainaoui, N., Delluc-Clavieres, A., Khoury, M.P., Azar, R., Pujol, F., Martineau, Y., Pyronnet, S., and Prats, A.C. (2009). Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription-translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Res* 37, 5267-5278.
- Conte, C., Riant, E., Toutain, C., Pujol, F., Arnal, J.F., Lenfant, F., and Prats, A.C. (2008). FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1alpha. *PLoS One* 3, e3078.
- Cornelis, S., Bruynooghe, Y., Denecker, G., Van Huffel, S., Tinton, S., and Beyaert, R. (2000). Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5, 597-605.
- Couderc, B., Zitvogel, L., Douin-Echinard, V., Djennane, L., Tahara, H., Favre, G., Lotze, M.T., and Robbins, P.D. (1998). Enhancement of antitumor immunity by expression of CD70 (CD27 ligand) or CD154 (CD40 ligand) costimulatory molecules in tumor cells. *Cancer Gene Ther* 5, 163-175.
- Couffinhal, T., Dufourcq, P., Daret, D., and Duplaa, C. (2001). [The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications]. *Rev Med Interne* 22, 1064-1082.
- Cox, C.M., D'Agostino, S.L., Miller, M.K., Heimark, R.L., and Krieg, P.A. (2006). Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 296, 177-189.
- Creancier, L., Mercier, P., Prats, A.C., and Morello, D. (2001). c-myc Internal ribosome entry site activity is developmentally controlled and subjected to a strong translational repression in adult transgenic mice. *Mol Cell Biol* 21, 1833-1840.
- Creancier, L., Morello, D., Mercier, P., and Prats, A.C. (2000). Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity ex vivo and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J Cell Biol* 150, 275-281.
- Dakin, R.S., Parker, A.L., Delles, C., Nicklin, S.A., and Baker, A.H. (2015). Efficient transduction of primary vascular cells by the rare adenovirus serotype 49 vector. *Hum Gene Ther* 26, 312-319.
- Dalzell, J.R., Rocchiccioli, J.P., Weir, R.A., Jackson, C.E., Padmanabhan, N., Gardner, R.S., Petrie, M.C., and McMurray, J.J. (2015). The Emerging Potential of the Apelin-APJ System in Heart Failure. *J Card Fail* 21, 489-498.
- Damiano, F., Alemanno, S., Gnoni, G.V., and Siculella, L. (2010). Translational control of the sterol-regulatory transcription factor SREBP-1 mRNA in response to serum starvation or ER stress is mediated by an internal ribosome entry site. *Biochem J* 429, 603-612.
- Das, A.K., Bin Abdullah, B.J., Dhillon, S.S., Vijanari, A., Anoop, C.H., and Gupta, P.K. (2013). Intra-arterial allogeneic mesenchymal stem cells for critical limb ischemia are safe and efficacious: report of a phase I study. *World J Surg* 37, 915-922.

- de Felipe, P., Luke, G.A., Brown, J.D., and Ryan, M.D. (2010). Inhibition of 2A-mediated 'cleavage' of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences. *Biotechnol J* 5, 213-223.
- de Felipe, P., Luke, G.A., Hughes, L.E., Gani, D., Halpin, C., and Ryan, M.D. (2006). E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol* 24, 68-75.
- de Tombe, P.P. (1998). Altered contractile function in heart failure. *Cardiovasc Res* 37, 367-380.
- del Monte, F., Harding, S.E., Schmidt, U., Matsui, T., Kang, Z.B., Dec, G.W., Gwathmey, J.K., Rosenzweig, A., and Hajjar, R.J. (1999). Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 100, 2308-2311.
- del Monte, F., Lebeche, D., Guerrero, J.L., Tsuji, T., Doye, A.A., Gwathmey, J.K., and Hajjar, R.J. (2004). Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5622-5627.
- del Monte, F., Williams, E., Lebeche, D., Schmidt, U., Rosenzweig, A., Gwathmey, J.K., Lewandowski, E.D., and Hajjar, R.J. (2001). Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation* 104, 1424-1429.
- Delewi, R., Hirsch, A., Tijssen, J.G., Schachinger, V., Wojakowski, W., Roncalli, J., Aakhus, S., Erbs, S., Assmus, B., Tendera, M., *et al.* (2014). Impact of intracoronary bone marrow cell therapy on left ventricular function in the setting of ST-segment elevation myocardial infarction: a collaborative meta-analysis. *Eur Heart J* 35, 989-998.
- Delluc-Clavieres, A., Le Bec, C., Van den Berghe, L., Conte, C., Allo, V., Danos, O., and Prats, A.C. (2008). Efficient gene transfer in skeletal muscle with AAV-derived bicistronic vector using the FGF-1 IRES. *Gene Ther* 15, 1090-1098.
- Derrington, E.A., Lopez-Lastra, M., and Darlix, J.L. (2005). Dicistronic MLV-retroviral vectors transduce neural precursors in vivo and co-express two genes in their differentiated neuronal progeny. *Retrovirology* 2, 60.
- Detillieux, K.A., Sheikh, F., Kardami, E., and Cattini, P.A. (2003). Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res* 57, 8-19.
- Di Pasquale, G., and Chiorini, J.A. (2006). AAV transcytosis through barrier epithelia and endothelium. *Mol Ther* 13, 506-516.
- Di Santo, S., Yang, Z., Wyler von Ballmoos, M., Voelzmann, J., Diehm, N., Baumgartner, I., and Kalka, C. (2009). Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One* 4, e5643.
- Di, Y., Zhang, Y., Nie, Q., and Chen, X. (2015). CCN1/Cyr61-PI3K/AKT signaling promotes retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy. *Int J Mol Med* 36, 1507-1518.
- Dick, S.A., and Epelman, S. (2016). Chronic Heart Failure and Inflammation: What Do We Really Know? *Circ Res* 119, 159-176.
- Diez, J., Querejeta, R., Lopez, B., Gonzalez, A., Larman, M., and Martinez Ubago, J.L. (2002). Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation* 105, 2512-2517.

- Diwan, A., Tran, T., Misra, A., and Mann, D.L. (2003). Inflammatory mediators and the failing heart: a translational approach. *Curr Mol Med* 3, 161-182.
- Douin, V., Bornes, S., Creancier, L., Rochaix, P., Favre, G., Prats, A.C., and Couderc, B. (2004). Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors. *BMC Biotechnol* 4, 16.
- Dua, A., and Lee, C.J. (2016). Epidemiology of Peripheral Arterial Disease and Critical Limb Ischemia. *Tech Vasc Interv Radiol* 19, 91-95.
- Endoh, M., Pulsinelli, W.A., and Wagner, J.A. (1994). Transient global ischemia induces dynamic changes in the expression of bFGF and the FGF receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 22, 76-88.
- Engel, F.B., Hsieh, P.C., Lee, R.T., and Keating, M.T. (2006). FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15546-15551.
- Engelmann, G.L., Dionne, C.A., and Jaye, M.C. (1993). Acidic fibroblast growth factor and heart development. Role in myocyte proliferation and capillary angiogenesis. *Circ Res* 72, 7-19.
- Epstein, S.E., Kornowski, R., Fuchs, S., and Dvorak, H.F. (2001). Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. *Circulation* 104, 115-119.
- Escors, D., and Breckpot, K. (2010). Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58, 107-119.
- Estrada, R., Li, N., Sarojini, H., An, J., Lee, M.J., and Wang, E. (2009). Secretome from mesenchymal stem cells induces angiogenesis via Cyr61. *J Cell Physiol* 219, 563-571.
- Eyries, M., Siegfried, G., Ciumas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F., and Soubrier, F. (2008). Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res* 103, 432-440.
- Fallot, S., Ben Naya, R., Hieblot, C., Mondon, P., Lacazette, E., Bouayadi, K., Kharrat, A., Touriol, C., and Prats, H. (2009). Alternative-splicing-based bicistronic vectors for ratio-controlled protein expression and application to recombinant antibody production. *Nucleic Acids Res* 37, e134.
- Fantin, A., Vieira, J.M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhodzhiy, S., Peri, F., Wilson, S.W., and Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116, 829-840.
- Fataccioli, V., Abergel, V., Wingertsmann, L., Neuville, P., Spitz, E., Adnot, S., Calenda, V., and Teiger, E. (2002). Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate. *Hum Gene Ther* 13, 1461-1470.
- Favaloro, L., Diez, M., Mendiz, O., Janavel, G.V., Valdivieso, L., Ratto, R., Garelli, G., Salmo, F., Criscuolo, M., Bercovich, A., *et al.* (2013). High-dose plasmid-mediated VEGF gene transfer is safe in patients with severe ischemic heart disease (Genesis-I). A phase I, open-label, two-year follow-up trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 82, 899-906.
- Ferrarini, M., Arsic, N., Recchia, F.A., Zentilin, L., Zacchigna, S., Xu, X., Linke, A., Giacca, M., and Hintze, T.H. (2006). Adeno-associated virus-mediated transduction of VEGF165 improves cardiac tissue viability and functional recovery after permanent coronary occlusion in conscious dogs. *Circ Res* 98, 954-961.
- Figeac, F., Lesault, P.F., Le Coz, O., Damy, T., Souktani, R., Trebeau, C., Schmitt, A., Ribot, J., Mounier, R., Guguin, A., *et al.* (2014). Nanotubular crosstalk with distressed

- cardiomyocytes stimulates the paracrine repair function of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 32, 216-230.
- Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., and Cavazzana-Calvo, M. (2011). Gene therapy for primary adaptive immune deficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 127, 1356-1359.
- Fisher, S.A., Doree, C., Mathur, A., and Martin-Rendon, E. (2015). Meta-analysis of cell therapy trials for patients with heart failure. *Circ Res* 116, 1361-1377.
- Fleury, S., Simeoni, E., Zuppinger, C., Deglon, N., von Segesser, L.K., Kappenberger, L., and Vassalli, G. (2003). Multiply attenuated, self-inactivating lentiviral vectors efficiently deliver and express genes for extended periods of time in adult rat cardiomyocytes in vivo. *Circulation* 107, 2375-2382.
- Flores-Ramirez, R., Uribe-Longoria, A., Rangel-Fuentes, M.M., Gutierrez-Fajardo, P., Salazar-Riojas, R., Cervantes-Garcia, D., Trevino-Ortiz, J.H., Benavides-Chereti, G.J., Espinosa-Oliveros, L.P., Limon-Rodriguez, R.H., *et al.* (2010). Intracoronary infusion of CD133+ endothelial progenitor cells improves heart function and quality of life in patients with chronic post-infarct heart insufficiency. *Cardiovasc Revasc Med* 11, 72-78.
- Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D., and Florkiewicz, E. (1995). Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol* 162, 388-399.
- Foldes, G., Horkay, F., Szokodi, I., Vuolteenaho, O., Ilves, M., Lindstedt, K.A., Mayranpaa, M., Sarman, B., Seres, L., Skoumal, R., *et al.* (2003). Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 480-485.
- Foley, T.R., Waldo, S.W., and Armstrong, E.J. (2016). Medical Therapy in Peripheral Artery Disease and Critical Limb Ischemia. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 18, 42.
- Foubert, P., Matrone, G., Souttou, B., Lere-Dean, C., Barateau, V., Plouet, J., Le Ricousse-Roussanne, S., Levy, B.I., Silvestre, J.S., and Tobelem, G. (2008). Coadministration of endothelial and smooth muscle progenitor cells enhances the efficiency of proangiogenic cell-based therapy. *Circ Res* 103, 751-760.
- Foussal, C., Lairez, O., Calise, D., Pathak, A., Guilbeau-Frugier, C., Valet, P., Parini, A., and Kunduzova, O. (2010). Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 584, 2363-2370.
- Frecha, C., Costa, C., Levy, C., Negre, D., Russell, S.J., Maisner, A., Salles, G., Peng, K.W., Cosset, F.L., and Verhoeyen, E. (2009). Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood* 114, 3173-3180.
- Frecha, C., Costa, C., Negre, D., Gauthier, E., Russell, S.J., Cosset, F.L., and Verhoeyen, E. (2008). Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* 112, 4843-4852.
- Fussenegger, M., Moser, S., and Bailey, J.E. (1998). pQuattro vectors allow one-step multigene metabolic engineering and auto-selection of quattrocistronic artificial mammalian operons. *Cytotechnology* 28, 229-235.
- Gandhi, P.U., Testani, J.M., and Ahmad, T. (2015). The Current and Potential Clinical Relevance of Heart Failure Biomarkers. *Curr Heart Fail Rep* 12, 318-327.
- Gao, M.H., Lai, N.C., McKirnan, M.D., Roth, D.A., Rubanyi, G.M., Dalton, N., Roth, D.M., and Hammond, H.K. (2004). Increased regional function and perfusion after intracoronary

- delivery of adenovirus encoding fibroblast growth factor 4: report of preclinical data. *Hum Gene Ther* 15, 574-587.
- Garbayo, E., Gavira, J.J., de Yebenes, M.G., Pelacho, B., Abizanda, G., Lana, H., Blanco-Prieto, M.J., and Prosper, F. (2016). Catheter-based Intramyocardial Injection of FGF1 or NRG1-loaded MPs Improves Cardiac Function in a Preclinical Model of Ischemia-Reperfusion. *Sci Rep* 6, 25932.
- Gashaw, I., Stiller, S., Boing, C., Kimmig, R., and Winterhager, E. (2008). Premenstrual regulation of the pro-angiogenic factor CYR61 in human endometrium. *Endocrinology* 149, 2261-2269.
- Geisler, A., Jungmann, A., Kurreck, J., Poller, W., Katus, H.A., Vetter, R., Fechner, H., and Muller, O.J. (2011). microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. *Gene Ther* 18, 199-209.
- Geisler, A., Schon, C., Grossl, T., Pinkert, S., Stein, E.A., Kurreck, J., Vetter, R., and Fechner, H. (2013). Application of mutated miR-206 target sites enables skeletal muscle-specific silencing of transgene expression of cardiotropic AAV9 vectors. *Mol Ther* 21, 924-933.
- Ghosh, A., Yue, Y., Shin, J.H., and Duan, D. (2009). Systemic Trans-splicing adeno-associated viral delivery efficiently transduces the heart of adult mdx mouse, a model for duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 20, 1319-1328.
- Giacca, M., and Zacchigna, S. (2012). VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond. *Gene Ther* 19, 622-629.
- Giordano, F.J., He, H., McDonough, P., Meyer, M., Sayen, M.R., and Dillmann, W.H. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer reconstitutes depressed sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase levels and shortens prolonged cardiac myocyte Ca²⁺ transients. *Circulation* 96, 400-403.
- Girard-Gagnepain, A., Amirache, F., Costa, C., Levy, C., Frecha, C., Fusil, F., Negre, D., Lavillette, D., Cosset, F.L., and Verhoeven, E. (2014). Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. *Blood* 124, 1221-1231.
- Giry-Laterriere, M., Verhoeven, E., and Salmon, P. (2011). Lentiviral vectors. *Methods Mol Biol* 737, 183-209.
- Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O.D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L.G., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., *et al.* (2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 20, 661-669.
- Gonzalez-Herrera, I.G., Prado-Lourenco, L., Pileur, F., Conte, C., Morin, A., Cabon, F., Prats, H., Vagner, S., Bayard, F., Audigier, S., *et al.* (2006). Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEB J* 20, 476-478.
- Greenberg, B., Butler, J., Felker, G.M., Ponikowski, P., Voors, A.A., Pogoda, J.M., Provost, R., Guerrero, J., Hajjar, R.J., and Zsebo, K.M. (2016). Prevalence of AAV1 neutralizing antibodies and consequences for a clinical trial of gene transfer for advanced heart failure. *Gene Ther* 23, 313-319.
- Grines, C.L., Watkins, M.W., Helmer, G., Penny, W., Brinker, J., Marmur, J.D., West, A., Rade, J.J., Marrott, P., Hammond, H.K., *et al.* (2002). Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 105, 1291-1297.

- Grines, C.L., Watkins, M.W., Mahmarian, J.J., Iskandrian, A.E., Rade, J.J., Marrott, P., Pratt, C., Kleiman, N., and Angiogene, G.T.S.G. (2003). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 42, 1339-1347.
- Grochot-Przeczek, A., Dulak, J., and Jozkowicz, A. (2013). Therapeutic angiogenesis for revascularization in peripheral artery disease. *Gene* 525, 220-228.
- Grote, K., Salguero, G., Ballmaier, M., Dangers, M., Drexler, H., and Schieffer, B. (2007). The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration. *Blood* 110, 877-885.
- Gruchala, M., Roy, H., Bhardwaj, S., and Yla-Herttuala, S. (2004). Gene therapy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 10, 407-423.
- Gruh, I., Wunderlich, S., Winkler, M., Schwanke, K., Heinke, J., Blomer, U., Ruhparwar, A., Rohde, B., Li, R.K., Haverich, A., *et al.* (2008). Human CMV immediate-early enhancer: a useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors. *J Gene Med* 10, 21-32.
- Guijarro, D., Lebrin, M., Lairez, O., Bourin, P., Piriou, N., Pozzo, J., Lande, G., Berry, M., Le Tourneau, T., Cussac, D., *et al.* (2016). Intramyocardial transplantation of mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia and impaired left ventricular function: Results of the MESAMI 1 pilot trial. *Int J Cardiol* 209, 258-265.
- Gwathmey, J.K., Copelas, L., MacKinnon, R., Schoen, F.J., Feldman, M.D., Grossman, W., and Morgan, J.P. (1987). Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61, 70-76.
- Gyongyosi, M., Wojakowski, W., Lemarchand, P., Lunde, K., Tendera, M., Bartunek, J., Marban, E., Assmus, B., Henry, T.D., Traverse, J.H., *et al.* (2015). Meta-Analysis of Cell-based CaRdiac stUdiEs (ACCRUE) in patients with acute myocardial infarction based on individual patient data. *Circ Res* 116, 1346-1360.
- Gyorgy, B., Fitzpatrick, Z., Crommentuijn, M.H., Mu, D., and Maguire, C.A. (2014). Naturally enveloped AAV vectors for shielding neutralizing antibodies and robust gene delivery in vivo. *Biomaterials* 35, 7598-7609.
- Habib, G.B., Heibig, J., Forman, S.A., Brown, B.G., Roberts, R., Terrin, M.L., and Bolli, R. (1991). Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. The TIMI Investigators. *Circulation* 83, 739-746.
- Hadri, L., Bobe, R., Kawase, Y., Ladage, D., Ishikawa, K., Atassi, F., Lebeche, D., Kranias, E.G., Leopold, J.A., Lompre, A.M., *et al.* (2010). SERCA2a gene transfer enhances eNOS expression and activity in endothelial cells. *Mol Ther* 18, 1284-1292.
- Hai-Jiang, W., Xin-Na, D., and Hui-Jun, D. (2008). Expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Am J Hematol* 83, 922-926.
- Hajjar, R.J., Kang, J.X., Gwathmey, J.K., and Rosenzweig, A. (1997). Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation* 95, 423-429.
- Hajjar, R.J., Zsebo, K., Deckelbaum, L., Thompson, C., Rudy, J., Yaroshinsky, A., Ly, H., Kawase, Y., Wagner, K., Borow, K., *et al.* (2008). Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *J Card Fail* 14, 355-367.

- Hamano, K., Li, T.S., Kobayashi, T., Hirata, K., Yano, M., Kohno, M., and Matsuzaki, M. (2002). Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 73, 1210-1215.
- Hansen, J.F. (1989). Coronary collateral circulation: clinical significance and influence on survival in patients with coronary artery occlusion. *Am Heart J* 117, 290-295.
- Hare, J.M., Fishman, J.E., Gerstenblith, G., DiFede Velazquez, D.L., Zambrano, J.P., Suncion, V.Y., Tracy, M., Gherlin, E., Johnston, P.V., Brinker, J.A., *et al.* (2012). Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 308, 2369-2379.
- Hare, J.M., Traverse, J.H., Henry, T.D., Dib, N., Strumpf, R.K., Schulman, S.P., Gerstenblith, G., DeMaria, A.N., Denktas, A.E., Gammon, R.S., *et al.* (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 54, 2277-2286.
- HAS (2014). Guide du parcours de soins "Insuffisance cardiaque".
- Hayakawa, Y., Chandra, M., Miao, W., Shirani, J., Brown, J.H., Dorn, G.W., 2nd, Armstrong, R.C., and Kitsis, R.N. (2003). Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of $\alpha(q)$ transgenic mice. *Circulation* 108, 3036-3041.
- He, L., Xu, J., Chen, L., and Li, L. (2015). Apelin/APJ signaling in hypoxia-related diseases. *Clin Chim Acta* 451, 191-198.
- Heart Protection Study Collaborative, G. (2002). MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360, 23-33.
- Hedman, M., Hartikainen, J., Syvanne, M., Stjernvall, J., Hedman, A., Kivela, A., Vanninen, E., Mussalo, H., Kauppila, E., Simula, S., *et al.* (2003). Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* 107, 2677-2683.
- Heil, M., and Schaper, W. (2004). Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res* 95, 449-458.
- Heil, M., Ziegelhoeffer, T., Pipp, F., Kostin, S., Martin, S., Clauss, M., and Schaper, W. (2002). Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2411-2419.
- Heilmann, C., von Samson, P., Schlegel, K., Attmann, T., von Specht, B.U., Beyersdorf, F., and Lutter, G. (2002). Comparison of protein with DNA therapy for chronic myocardial ischemia using fibroblast growth factor-2. *Eur J Cardiothorac Surg* 22, 957-964.
- Heilmann, C.A., Attmann, T., Thiem, A., Haffner, E., Beyersdorf, F., and Lutter, G. (2003). Gene therapy in cardiac surgery: intramyocardial injection of naked plasmid DNA for chronic myocardial ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg* 24, 785-793.
- Heissig, B., Rafii, S., Akiyama, H., Ohki, Y., Sato, Y., Rafael, T., Zhu, Z., Hicklin, D.J., Okumura, K., Ogawa, H., *et al.* (2005). Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. *J Exp Med* 202, 739-750.

- Heldman, A.W., DiFede, D.L., Fishman, J.E., Zambrano, J.P., Trachtenberg, B.H., Karantalis, V., Mushtaq, M., Williams, A.R., Suncion, V.Y., McNiece, I.K., *et al.* (2014). Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA* 311, 62-73.
- Hendel, R.C., Henry, T.D., Rocha-Singh, K., Isner, J.M., Kereiakes, D.J., Giordano, F.J., Simons, M., and Bonow, R.O. (2000). Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation* 101, 118-121.
- Henry, T.D., Annex, B.H., McKendall, G.R., Azrin, M.A., Lopez, J.J., Giordano, F.J., Shah, P.K., Willerson, J.T., Benza, R.L., Berman, D.S., *et al.* (2003). The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107, 1359-1365.
- Henry, T.D., Grines, C.L., Watkins, M.W., Dib, N., Barbeau, G., Moreadith, R., Andrasfay, T., and Engler, R.L. (2007). Effects of Ad5FGF-4 in patients with angina: an analysis of pooled data from the AGENT-3 and AGENT-4 trials. *J Am Coll Cardiol* 50, 1038-1046.
- Henry, T.D., Rocha-Singh, K., Isner, J.M., Kereiakes, D.J., Giordano, F.J., Simons, M., Losordo, D.W., Hendel, R.C., Bonow, R.O., Eppler, S.M., *et al.* (2001). Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Heart J* 142, 872-880.
- Herrmann, J.L., Wang, Y., Abarbanell, A.M., Weil, B.R., Tan, J., and Meldrum, D.R. (2010). Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor- α improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. *Shock* 33, 24-30.
- Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Kaminska, A., Fuchs, M., Klein, G., Podewski, E., Grote, K., Kiian, I., Wollert, K.C., Hilfiker, A., *et al.* (2004). Regulation of proangiogenic factor CCN1 in cardiac muscle: impact of ischemia, pressure overload, and neurohumoral activation. *Circulation* 109, 2227-2233.
- Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Fuchs, M., Kaminski, K., Lichtenberg, A., Rothkotter, H.J., Schieffer, B., and Drexler, H. (2002). Expression of CYR61, an angiogenic immediate early gene, in arteriosclerosis and its regulation by angiotensin II. *Circulation* 106, 254-260.
- Hinkel, R., Trenkwalder, T., and Kupatt, C. (2011). Gene therapy for ischemic heart disease. *Expert Opin Biol Ther* 11, 723-737.
- Holcik, M., Lefebvre, C., Yeh, C., Chow, T., and Korneluk, R.G. (1999). A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat Cell Biol* 1, 190-192.
- Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 318-327.
- Hou, D., Youssef, E.A., Brinton, T.J., Zhang, P., Rogers, P., Price, E.T., Yeung, A.C., Johnstone, B.H., Yock, P.G., and March, K.L. (2005). Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* 112, 1150-1156.
- Houck, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M., Winer, J., and Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267, 26031-26037.
- Hu, X., Yu, S.P., Fraser, J.L., Lu, Z., Ogle, M.E., Wang, J.A., and Wei, L. (2008). Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function

- via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 135, 799-808.
- Huez, I., Creancier, L., Audigier, S., Gensac, M.C., Prats, A.C., and Prats, H. (1998). Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol* 18, 6178-6190.
- Humbert, J.M., Frecha, C., Amirache Bouafia, F., N'Guyen, T.H., Boni, S., Cosset, F.L., Verhoeven, E., and Halary, F. (2012). Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vectors are highly superior to vesicular stomatitis virus G pseudotypes for genetic modification of monocyte-derived dendritic cells. *J Virol* 86, 5192-5203.
- Idei, N., Soga, J., Hata, T., Fujii, Y., Fujimura, N., Mikami, S., Maruhashi, T., Nishioka, K., Hidaka, T., Kihara, Y., *et al.* (2011). Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: a comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and Buerger disease. *Circ Cardiovasc Interv* 4, 15-25.
- Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., McTiernan, C.F., Kay, M.A., and Nakai, H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther* 14, 45-53.
- Isayeva, T., Ren, C., and Ponnazhagan, S. (2005). Recombinant adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic prevention in a mouse model of intraperitoneal ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 11, 1342-1347.
- Ishida, A., Murray, J., Saito, Y., Kanthou, C., Benzakour, O., Shibuya, M., and Wijelath, E.S. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 188, 359-368.
- Ishikane, S., Ohnishi, S., Yamahara, K., Sada, M., Harada, K., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Kitamura, S., Nagaya, N., *et al.* (2008). Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Stem Cells* 26, 2625-2633.
- Isner, J.M., Pieczek, A., Schainfeld, R., Blair, R., Haley, L., Asahara, T., Rosenfield, K., Razvi, S., Walsh, K., and Symes, J.F. (1996). Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 348, 370-374.
- Itoh, N. (2007). The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol Pharm Bull* 30, 1819-1825.
- Iwakura, A., Fujita, M., Ikemoto, M., Hasegawa, K., Nohara, R., Sasayama, S., Miyamoto, S., Yamazato, A., Tambara, K., and Komeda, M. (2000). Myocardial ischemia enhances the expression of acidic fibroblast growth factor in human pericardial fluid. *Heart Vessels* 15, 112-116.
- Iwase, T., Nagaya, N., Fujii, T., Itoh, T., Murakami, S., Matsumoto, T., Kangawa, K., and Kitamura, S. (2005). Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 66, 543-551.
- Iwatate, M., Miura, T., Ikeda, Y., Kawamura, S., Dairaku, Y., Okamura, T., Kimura, M., Yamaguchi, K., Ueno, H., and Matsuzaki, M. (2001). Effects of in vivo gene transfer of fibroblast growth factor-2 on cardiac function and collateral vessel formation in the microembolized rabbit heart. *Jpn Circ J* 65, 226-231.
- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., *et al.* (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12, 149-162.

- Jackson, A., Friedman, S., Zhan, X., Engleka, K.A., Forough, R., and Maciag, T. (1992). Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10691-10695.
- Jackson, R.J. (1991). mRNA translation. Initiation without an end. *Nature* 353, 14-15.
- Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62, 2636-2643.
- Janssens, S., Dubois, C., Bogaert, J., Theunissen, K., Deroose, C., Desmet, W., Kalantzi, M., Herbots, L., Sinnaeve, P., Dens, J., *et al.* (2006). Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367, 113-121.
- Japp, A.G., Cruden, N.L., Amer, D.A., Li, V.K., Goudie, E.B., Johnston, N.R., Sharma, S., Neilson, I., Webb, D.J., Megson, I.L., *et al.* (2008). Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol* 52, 908-913.
- Japp, A.G., Cruden, N.L., Barnes, G., van Gemeren, N., Mathews, J., Adamson, J., Johnston, N.R., Denvir, M.A., Megson, I.L., Flapan, A.D., *et al.* (2010). Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation* 121, 1818-1827.
- Jaski, B.E., Jessup, M.L., Mancini, D.M., Cappola, T.P., Pauly, D.F., Greenberg, B., Borow, K., Dittrich, H., Zsebo, K.M., Hajjar, R.J., *et al.* (2009). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail* 15, 171-181.
- Jazwa, A., Tomczyk, M., Taha, H.M., Hytonen, E., Stoszko, M., Zentilin, L., Giacca, M., Yla-Herttuala, S., Emanuelli, C., Jozkowicz, A., *et al.* (2013). Arteriogenic therapy based on simultaneous delivery of VEGF-A and FGF4 genes improves the recovery from acute limb ischemia. *Vasc Cell* 5, 13.
- Jeevanantham, V., Butler, M., Saad, A., Abdel-Latif, A., Zuba-Surma, E.K., and Dawn, B. (2012). Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 126, 551-568.
- Jessup, M., Greenberg, B., Mancini, D., Cappola, T., Pauly, D.F., Jaski, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K.M., Dittrich, H., Hajjar, R.J., *et al.* (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 124, 304-313.
- Jiang, Z.S., Srisakuldee, W., Soulet, F., Bouche, G., and Kardami, E. (2004). Non-angiogenic FGF-2 protects the ischemic heart from injury, in the presence or absence of reperfusion. *Cardiovasc Res* 62, 154-166.
- Jie, K.E., Goossens, M.H., van Oostrom, O., Lilien, M.R., and Verhaar, M.C. (2009). Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis* 202, 345-347.
- Johnson, C., Sung, H.J., Lessner, S.M., Fini, M.E., and Galis, Z.S. (2004). Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching. *Circ Res* 94, 262-268.
- Kachi, S., Binley, K., Yokoi, K., Umeda, N., Akiyama, H., Muramatsu, D., Iqbal, S., Kan, O., Naylor, S., and Campochiaro, P.A. (2009). Equine infectious anemia viral vector-mediated codelivery of endostatin and angiostatin driven by retinal pigmented

- epithelium-specific VMD2 promoter inhibits choroidal neovascularization. *Hum Gene Ther* 20, 31-39.
- Kajstura, J., Cigola, E., Malhotra, A., Li, P., Cheng, W., Meggs, L.G., and Anversa, P. (1997). Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 29, 859-870.
- Kalin, R.E., Kretz, M.P., Meyer, A.M., Kispert, A., Heppner, F.L., and Brandli, A.W. (2007). Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev Biol* 305, 599-614.
- Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., Masaki, H., Mori, Y., Iba, O., Tateishi, E., *et al.* (2001). Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 104, 1046-1052.
- Kardami, E., Liu, L., and Doble, B.W. (1991). Basic fibroblast growth factor in cultured cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 638, 244-255.
- Kaski, J.C., and Consuegra-Sanchez, L. (2013). Evaluation of ASPIRE trial: a Phase III pivotal registration trial, using intracoronary administration of Generx (Ad5FGF4) to treat patients with recurrent angina pectoris. *Expert Opin Biol Ther* 13, 1749-1753.
- Kastrup, J., Jorgensen, E., Fuchs, S., Nikol, S., Botker, H.E., Gyongyosi, M., Glogar, D., and Kornowski, R. (2011). A randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study of the safety and efficacy of BIOBYPASS (AdGVVEGF121.10NH) gene therapy in patients with refractory advanced coronary artery disease: the NOVA trial. *EuroIntervention* 6, 813-818.
- Kastrup, J., Jorgensen, E., Ruck, A., Tagil, K., Glogar, D., Ruzyllo, W., Botker, H.E., Dudek, D., Drvota, V., Hesse, B., *et al.* (2005). Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol* 45, 982-988.
- Katugampola, S.D., Maguire, J.J., Matthewson, S.R., and Davenport, A.P. (2001). [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br J Pharmacol* 132, 1255-1260.
- Kawamoto, A., Katayama, M., Handa, N., Kinoshita, M., Takano, H., Horii, M., Sadamoto, K., Yokoyama, A., Yamanaka, T., Onodera, R., *et al.* (2009). Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial. *Stem Cells* 27, 2857-2864.
- Kawase, Y., Ly, H.Q., Prunier, F., Lebeche, D., Shi, Y., Jin, H., Hadri, L., Yoneyama, R., Hoshino, K., Takewa, Y., *et al.* (2008). Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 51, 1112-1119.
- Kearns-Jonker, M., Dai, W., Gunthart, M., Fuentes, T., Yeh, H.Y., Gerczuk, P., Pera, M., Mummery, C., and Kloner, R.A. (2012). Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Influence Gene Expression in Donor Cardiomyocytes and the Recipient Heart. *J Stem Cell Res Ther* S1.
- Kidoya, H., Ueno, M., Yamada, Y., Mochizuki, N., Nakata, M., Yano, T., Fujii, R., and Takakura, N. (2008). Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J* 27, 522-534.

- Kilian, E.G., Sadoni, S., Vicol, C., Kelly, R., van Hulst, K., Schwaiger, M., Kupatt, C., Boekstegers, P., Pillai, R., Channon, K., *et al.* (2010). Myocardial transfection of hypoxia inducible factor-1alpha via an adenoviral vector during coronary artery bypass grafting. - A multicenter phase I and safety study. *Circ J* 74, 916-924.
- Kinugawa, S., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Ide, T., Suematsu, N., Satoh, S., Utsumi, H., and Takeshita, A. (2000). Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ Res* 87, 392-398.
- Kireeva, M.L., Lam, S.C., and Lau, L.F. (1998). Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product Cyr61 is mediated through integrin alphavbeta3. *J Biol Chem* 273, 3090-3096.
- Kireeva, M.L., Mo, F.E., Yang, G.P., and Lau, L.F. (1996). Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol* 16, 1326-1334.
- Klepanec, A., Mistrik, M., Altaner, C., Valachovicova, M., Olejarova, I., Slysco, R., Balazs, T., Urandova, T., Hladikova, D., Liska, B., *et al.* (2012). No difference in intra-arterial and intramuscular delivery of autologous bone marrow cells in patients with advanced critical limb ischemia. *Cell Transplant* 21, 1909-1918.
- Koguchi, W., Kobayashi, N., Takeshima, H., Ishikawa, M., Sugiyama, F., and Ishimitsu, T. (2012). Cardioprotective effect of apelin-13 on cardiac performance and remodeling in end-stage heart failure. *Circ J* 76, 137-144.
- Kolesnikova, T.V., and Lau, L.F. (1998). Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Oncogene* 16, 747-754.
- Korc, M., and Friesel, R.E. (2009). The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 639-651.
- Korman, A.J., Frantz, J.D., Strominger, J.L., and Mulligan, R.C. (1987). Expression of human class II major histocompatibility complex antigens using retrovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2150-2154.
- Koshikawa, M., Shimodaira, S., Yoshioka, T., Kasai, H., Watanabe, N., Wada, Y., Seto, T., Fukui, D., Amano, J., and Ikeda, U. (2006). Therapeutic angiogenesis by bone marrow implantation for critical hand ischemia in patients with peripheral arterial disease: a pilot study. *Curr Med Res Opin* 22, 793-798.
- Kozak, M. (1979). Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA when initiation is perturbed by lowering magnesium or adding drugs. *J Biol Chem* 254, 4731-4738.
- Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 108, 229-241.
- Kris-Etherton, P.M., Lichtenstein, A.H., Howard, B.V., Steinberg, D., Witztum, J.L., Nutrition Committee of the American Heart Association Council on Nutrition, P.A., and Metabolism (2004). Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation* 110, 637-641.
- Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., Arab, S., Chen, M., Maekawa, Y., Leschnik, M., Leibbrandt, A., Markovic, M., Schwaighofer, J., *et al.* (2007). Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res* 101, e32-42.
- Kukula, K., Chojnowska, L., Dabrowski, M., Witkowski, A., Chmielak, Z., Skwarek, M., Kadziela, J., Teresinska, A., Malecki, M., Janik, P., *et al.* (2011). Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth

- factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD). *Am Heart J* 161, 581-589.
- Kumar, P., and Woon-Khiong, C. (2011). Optimization of lentiviral vectors generation for biomedical and clinical research purposes: contemporary trends in technology development and applications. *Curr Gene Ther* 11, 144-153.
- Kunz, M., Moeller, S., Koczan, D., Lorenz, P., Wenger, R.H., Glocker, M.O., Thiesen, H.J., Gross, G., and Ibrahim, S.M. (2003). Mechanisms of hypoxic gene regulation of angiogenesis factor Cyr61 in melanoma cells. *J Biol Chem* 278, 45651-45660.
- Kupatt, C., Hinkel, R., Pfosser, A., El-Aouni, C., Wuchrer, A., Fritz, A., Globisch, F., Thormann, M., Horstkotte, J., Lebherz, C., *et al.* (2010). Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *J Am Coll Cardiol* 56, 414-422.
- Kusumanto, Y.H., van Weel, V., Mulder, N.H., Smit, A.J., van den Dungen, J.J., Hooymans, J.M., Sluiter, W.J., Tio, R.A., Quax, P.H., Gans, R.O., *et al.* (2006). Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther* 17, 683-691.
- Kutryk, M., Kassam, S., and DJ, S. (2001). L'angiogenèse : une nouvelle technologie pour le traitement de la coronaropathie. *Cardiologie* VI, 1-8.
- Kuwabara, K., Ogawa, S., Matsumoto, M., Koga, S., Clauss, M., Pinsky, D.J., Lyn, P., Leavy, J., Witte, L., Joseph-Silverstein, J., *et al.* (1995). Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4606-4610.
- Kwabi-Addo, B., Ozen, M., and Ittmann, M. (2004). The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 11, 709-724.
- Laham, R.J., Chronos, N.A., Pike, M., Leimbach, M.E., Udelson, J.E., Pearlman, J.D., Pettigrew, R.I., Whitehouse, M.J., Yoshizawa, C., and Simons, M. (2000). Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol* 36, 2132-2139.
- Laham, R.J., Sellke, F.W., Edelman, E.R., Pearlman, J.D., Ware, J.A., Brown, D.L., Gold, J.P., and Simons, M. (1999). Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 100, 1865-1871.
- Lang, K.J., Kappel, A., and Goodall, G.J. (2002). Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell* 13, 1792-1801.
- Laroumanie, F., Douin-Echinard, V., Pozzo, J., Lairez, O., Tortosa, F., Vinel, C., Delage, C., Calise, D., Dutaur, M., Parini, A., *et al.* (2014). CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload. *Circulation* 129, 2111-2124.
- Lau, L.F. (2011). CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein. *Cell Mol Life Sci* 68, 3149-3163.
- Lau, L.F., and Lam, S.C. (1999). The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 248, 44-57.

- Lazarous, D.F., Unger, E.F., Epstein, S.E., Stine, A., Arevalo, J.L., Chew, E.Y., and Quyyumi, A.A. (2000). Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol* 36, 1239-1244.
- Le, T.V., Mironova, E., Garcin, D., and Compans, R.W. (2011). Induction of influenza-specific mucosal immunity by an attenuated recombinant Sendai virus. *PLoS One* 6, e18780.
- Leconte, I., Fox, J.C., Baldwin, H.S., Buck, C.A., and Swain, J.L. (1998). Adenoviral-mediated expression of antisense RNA to fibroblast growth factors disrupts murine vascular development. *Dev Dyn* 213, 421-430.
- Lederman, R.J., Mendelsohn, F.O., Anderson, R.D., Saucedo, J.F., Tenaglia, A.N., Hermiller, J.B., Hillegass, W.B., Rocha-Singh, K., Moon, T.E., Whitehouse, M.J., *et al.* (2002). Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 359, 2053-2058.
- Lee, C.J., Fan, X., Guo, X., and Medin, J.A. (2011). Promoter-specific lentivectors for long-term, cardiac-directed therapy of Fabry disease. *J Cardiol* 57, 115-122.
- Lee, H.Y., Chung, J.W., Youn, S.W., Kim, J.Y., Park, K.W., Koo, B.K., Oh, B.H., Park, Y.B., Chaqour, B., Walsh, K., *et al.* (2007a). Forkhead transcription factor FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res* 100, 372-380.
- Lee, J.S., Kim, J.M., Kim, K.L., Jang, H.S., Shin, I.S., Jeon, E.S., Suh, W., Byun, J., and Kim, D.K. (2007b). Combined administration of naked DNA vectors encoding VEGF and bFGF enhances tissue perfusion and arteriogenesis in ischemic hindlimb. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 752-758.
- Leri, A., Kajstura, J., and Anversa, P. (2011). Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res* 109, 941-961.
- Leu, S.J., Lam, S.C., and Lau, L.F. (2002). Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 6 \beta 1$ in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 46248-46255.
- Li, L., Chen, X., Wang, W.E., and Zeng, C. (2016). How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? *Stem Cells Int* 2016, 9682757.
- Li, L., Zeng, H., Hou, X., He, X., and Chen, J.X. (2013). Myocardial injection of apelin-overexpressing bone marrow cells improves cardiac repair via upregulation of Sirt3 after myocardial infarction. *PLoS One* 8, e71041.
- Li, Z.H., Wen, X.Y., Mandelbaum, S., Falcioni, N., Hawley, T.S., Hawley, R.G., and Stewart, A.K. (2003). Improved therapeutic outcome following combination immunogene vaccination therapy in murine myeloma. *Leuk Lymphoma* 44, 1775-1784.
- Liew, A., Bhattacharya, V., Shaw, J., and Stansby, G. (2016). Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Angiology* 67, 444-455.
- Liew, A., and O'Brien, T. (2012). Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia. *Stem Cell Res Ther* 3, 28.
- Lin, M.T., Kuo, I.H., Chang, C.C., Chu, C.Y., Chen, H.Y., Lin, B.R., Sureshbabu, M., Shih, H.J., and Kuo, M.L. (2008). Involvement of hypoxia-inducing factor-1 α -dependent plasminogen activator inhibitor-1 up-regulation in Cyr61/CCN1-induced gastric cancer cell invasion. *J Biol Chem* 283, 15807-15815.
- Lin, R.Z., Moreno-Luna, R., Zhou, B., Pu, W.T., and Melero-Martin, J.M. (2012). Equal modulation of endothelial cell function by four distinct tissue-specific mesenchymal stem cells. *Angiogenesis* 15, 443-455.

- Lipinski, M.J., Biondi-Zoccai, G.G., Abbate, A., Khianey, R., Sheiban, I., Bartunek, J., Vanderheyden, M., Kim, H.S., Kang, H.J., Strauer, B.E., *et al.* (2007). Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 50, 1761-1767.
- Lipskaia, L., Hadri, L., Lopez, J.J., Hajjar, R.J., and Bobe, R. (2013). Benefit of SERCA2a gene transfer to vascular endothelial and smooth muscle cells: a new aspect in therapy of cardiovascular diseases. *Curr Vasc Pharmacol* 11, 465-479.
- Liu, F.P., Dong, J.J., Sun, S.J., Gao, W.Y., Zhang, Z.W., Zhou, X.J., Yang, L., Zhao, J.Y., Yao, J.M., Liu, M., *et al.* (2012). Autologous bone marrow stem cell transplantation in critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Chin Med J (Engl)* 125, 4296-4300.
- Liu, Y., Xu, Y., Fang, F., Zhang, J., Guo, L., and Weng, Z. (2015). Therapeutic Efficacy of Stem Cell-based Therapy in Peripheral Arterial Disease: A Meta-Analysis. *PLoS One* 10, e0125032.
- Lorier, G., Tourino, C., and Kalil, R.A. (2011). Coronary angiogenesis as an endogenous response to myocardial ischemia in adults. *Arq Bras Cardiol* 97, e140-148.
- Losordo, D.W., Vale, P.R., Symes, J.F., Dunnington, C.H., Esakof, D.D., Maysky, M., Ashare, A.B., Lathi, K., and Isner, J.M. (1998). Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98, 2800-2804.
- Lotze, M.T., Zitvogel, L., Campbell, R., Robbins, P.D., Elder, E., Haluszczak, C., Martin, D., Whiteside, T.L., Storkus, W.J., and Tahara, H. (1996). Cytokine gene therapy of cancer using interleukin-12: murine and clinical trials. *Ann N Y Acad Sci* 795, 440-454.
- Louis Jeune, V., Joergensen, J.A., Hajjar, R.J., and Weber, T. (2013). Pre-existing anti-adenovirus-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Hum Gene Ther Methods* 24, 59-67.
- Lu, D., Chen, B., Liang, Z., Deng, W., Jiang, Y., Li, S., Xu, J., Wu, Q., Zhang, Z., Xie, B., *et al.* (2011). Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 92, 26-36.
- Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S., Arnesen, H., Abdelnoor, M., Egeland, T., Endresen, K., Ilebakk, A., Mangschau, A., Fjeld, J.G., *et al.* (2006). Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, 1199-1209.
- Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J.A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B., *et al.* (2002). Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 8, 831-840.
- Lyon, A.R., Bannister, M.L., Collins, T., Pearce, E., Sepehrpour, A.H., Dubb, S.S., Garcia, E., O'Gara, P., Liang, L., Kohlbrenner, E., *et al.* (2011). SERCA2a gene transfer decreases sarcoplasmic reticulum calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4, 362-372.
- Ma, N., Stamm, C., Kaminski, A., Li, W., Kleine, H.D., Muller-Hilke, B., Zhang, L., Ladilov, Y., Egger, D., and Steinhoff, G. (2005). Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res* 66, 45-54.

- Macejak, D.G., and Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353, 90-94.
- Malecki, M., Swoboda, P., Jastrzebski, Z., and Janik, P. (2004). In vivo study of angiogenic plasmid preparations--the bicistronic plasmid as a new type of drug for vascular diseases. *Acta Pol Pharm* 61, 289-295.
- Mann, R., Mulligan, R.C., and Baltimore, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33, 153-159.
- Marcel, V., Ghayad, S.E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A.P., Solano-Gonzalez, E., Vendrell, J.A., Hacot, S., Mertani, H.C., Albaret, M.A., *et al.* (2013). p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell* 24, 318-330.
- Mariani, J.A., Smolic, A., Prevolos, A., Byrne, M.J., Power, J.M., and Kaye, D.M. (2011). Augmentation of left ventricular mechanics by recirculation-mediated AAV2/1-SERCA2a gene delivery in experimental heart failure. *Eur J Heart Fail* 13, 247-253.
- Marks, A.R. (2013). Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest* 123, 46-52.
- Martin-Rendon, E., Brunskill, S.J., Hyde, C.J., Stanworth, S.J., Mathur, A., and Watt, S.M. (2008). Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 29, 1807-1818.
- Martin, K.R., Klein, R.L., and Quigley, H.A. (2002). Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 28, 267-275.
- Martineau, Y., Le Bec, C., Monbrun, L., Allo, V., Chiu, I.M., Danos, O., Moine, H., Prats, H., and Prats, A.C. (2004). Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol* 24, 7622-7635.
- Masaki, I., Yonemitsu, Y., Yamashita, A., Sata, S., Tanii, M., Komori, K., Nakagawa, K., Hou, X., Nagai, Y., Hasegawa, M., *et al.* (2002). Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res* 90, 966-973.
- Massa, M., Rosti, V., Ferrario, M., Campanelli, R., Ramajoli, I., Rosso, R., De Ferrari, G.M., Ferlini, M., Goffredo, L., Bertoletti, A., *et al.* (2005). Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105, 199-206.
- Mathison, M., Singh, V.P., Gersch, R.P., Ramirez, M.O., Cooney, A., Kaminsky, S.M., Chiuchiolo, M.J., Nasser, A., Yang, J., Crystal, R.G., *et al.* (2014). "Triplet" polycistronic vectors encoding Gata4, Mef2c, and Tbx5 enhances postinfarct ventricular functional improvement compared with singlet vectors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 148, 1656-1664 e1652.
- Matsunaga, T., Warltier, D.C., Weihrauch, D.W., Moniz, M., Tessmer, J., and Chilian, W.M. (2000). Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide. *Circulation* 102, 3098-3103.
- Mayrhofer, P., Schleef, M., and Jechlinger, W. (2009). Use of minicircle plasmids for gene therapy. *Methods Mol Biol* 542, 87-104.
- McNeill, B., Vulesevic, B., Ostojic, A., Ruel, M., and Suuronen, E.J. (2015). Collagen matrix-induced expression of integrin alphaVbeta3 in circulating angiogenic cells can be

- targeted by matricellular protein CCN1 to enhance their function. *FASEB J* 29, 1198-1207.
- Meier, P., Hemingway, H., Lansky, A.J., Knapp, G., Pitt, B., and Seiler, C. (2012). The impact of the coronary collateral circulation on mortality: a meta-analysis. *Eur Heart J* 33, 614-621.
- Mercadier, J.J., Lompre, A.M., Duc, P., Boheler, K.R., Fraysse, J.B., Wisnewsky, C., Allen, P.D., Komajda, M., and Schwartz, K. (1990). Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 85, 305-309.
- Merentie, M., Lottonen-Raikaslehto, L., Parviainen, V., Huusko, J., Pikkarainen, S., Mendel, M., Laham-Karam, N., Karja, V., Rissanen, R., Hedman, M., *et al.* (2016). Efficacy and safety of myocardial gene transfer of adenovirus, adeno-associated virus and lentivirus vectors in the mouse heart. *Gene Ther* 23, 296-305.
- Meyer, G.P., Wollert, K.C., Lotz, J., Steffens, J., Lippolt, P., Fichtner, S., Hecker, H., Schaefer, A., Arseniev, L., Hertenstein, B., *et al.* (2006). Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 113, 1287-1294.
- Meyer, K., Hodwin, B., Ramanujam, D., Engelhardt, S., and Sarikas, A. (2016). Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis. *J Am Coll Cardiol* 67, 2018-2028.
- Meyuhas, R., Pikarsky, E., Tavor, E., Klar, A., Abramovitch, R., Hochman, J., Lago, T.G., and Honigman, A. (2008). A Key role for cyclic AMP-responsive element binding protein in hypoxia-mediated activation of the angiogenesis factor CCN1 (CYR61) in Tumor cells. *Mol Cancer Res* 6, 1397-1409.
- Mi, Y.F., Li, X.Y., Tang, L.J., Lu, X.C., Fu, Z.Q., and Ye, W.H. (2009). Improvement in cardiac function after sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene transfer in a beagle heart failure model. *Chin Med J (Engl)* 122, 1423-1428.
- Mias, C., Lairez, O., Trouche, E., Roncalli, J., Calise, D., Seguelas, M.H., Ordener, C., Piercecchi-Marti, M.D., Auge, N., Salvayre, A.N., *et al.* (2009). Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells* 27, 2734-2743.
- Mias, C., Trouche, E., Seguelas, M.H., Calcagno, F., Dignat-George, F., Sabatier, F., Piercecchi-Marti, M.D., Daniel, L., Bianchi, P., Calise, D., *et al.* (2008). Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. *Stem Cells* 26, 1749-1757.
- Mills, J.L., and Porter, J.M. (1991). Basic data related to clinical decision-making in acute limb ischemia. *Ann Vasc Surg* 5, 96-98.
- Mingozzi, F., Meulenbergh, J.J., Hui, D.J., Basner-Tschakarjan, E., Hasbrouck, N.C., Edmonson, S.A., Hutnick, N.A., Betts, M.R., Kastelein, J.J., Stroes, E.S., *et al.* (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 114, 2077-2086.
- Miyamoto, M.I., del Monte, F., Schmidt, U., DiSalvo, T.S., Kang, Z.B., Matsui, T., Guerrero, J.L., Gwathmey, J.K., Rosenzweig, A., and Hajjar, R.J. (2000). Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 793-798.

- Mo, F.E., and Lau, L.F. (2006). The matricellular protein CCN1 is essential for cardiac development. *Circ Res* 99, 961-969.
- Mo, F.E., Muntean, A.G., Chen, C.C., Stolz, D.B., Watkins, S.C., and Lau, L.F. (2002). CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol Cell Biol* 22, 8709-8720.
- Moazzami, K., Moazzami, B., Roohi, A., Nedjat, S., and Dolmatova, E. (2014). Local intramuscular transplantation of autologous mononuclear cells for critical lower limb ischaemia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD008347.
- Monteil, C., Mulder, P., and Thuillez, C. (2004). Stress oxydant et insuffisance cardiaque : une cible thérapeutique utopique ? *Médecine thérapeutique Cardiologie* 2, 78-85.
- Moore-Morris, T., Guimaraes-Camboa, N., Yutzey, K.E., Puceat, M., and Evans, S.M. (2015). Cardiac fibroblasts: from development to heart failure. *J Mol Med (Berl)* 93, 823-830.
- Morfoisse, F., Kuchnio, A., Frainay, C., Gomez-Brouchet, A., Delisle, M.B., Marzi, S., Helfer, A.C., Hantelys, F., Pujol, F., Guillermet-Guibert, J., *et al.* (2014). Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1alpha-independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep* 6, 155-167.
- Morfoisse, F., Tatin, F., Hantelys, F., Adoue, A., Helfer, A.C., Cassant-Sourdy, S., Pujol, F., Gomez-Brouchet, A., Ligat, L., Lopez, F., *et al.* (2016). Nucleolin Promotes Heat Shock-Associated Translation of VEGF-D to Promote Tumor Lymphangiogenesis. *Cancer Res* 76, 4394-4405.
- Morgan, R.A., Couture, L., Elroy-Stein, O., Ragheb, J., Moss, B., and Anderson, W.F. (1992). Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucleic Acids Res* 20, 1293-1299.
- Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W.A., and Fuerst, T.R. (1990). Product review. New mammalian expression vectors. *Nature* 348, 91-92.
- Mottaghi, S., Larijani, B., and Sharifi, A.M. (2012). Apelin 13: a novel approach to enhance efficacy of hypoxic preconditioned mesenchymal stem cells for cell therapy of diabetes. *Med Hypotheses* 79, 717-718.
- Motukuru, V., Suresh, K.R., Vivekanand, V., Raj, S., and Girija, K.R. (2008). Therapeutic angiogenesis in Buerger's disease (thromboangiitis obliterans) patients with critical limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells. *J Vasc Surg* 48, 53S-60S; discussion 60S.
- Muona, K., Makinen, K., Hedman, M., Manninen, H., and Yla-Herttuala, S. (2012). 10-year safety follow-up in patients with local VEGF gene transfer to ischemic lower limb. *Gene Ther* 19, 392-395.
- Murakami, M., and Simons, M. (2008). Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol* 15, 215-220.
- Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J.F., Fishman, M.C., *et al.* (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101, 2567-2578.
- Nakanishi, M., and Otsu, M. (2012). Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Curr Gene Ther* 12, 410-416.
- Nanbru, C., Lafon, I., Audigier, S., Gensac, M.C., Vagner, S., Huez, G., and Prats, A.C. (1997). Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem* 272, 32061-32066.

- Nassal, M.M., Wan, X., Laurita, K.R., and Cutler, M.J. (2015). Atrial SERCA2a Overexpression Has No Affect on Cardiac Alternans but Promotes Arrhythmogenic SR Ca²⁺ Triggers. *PLoS One* 10, e0137359.
- Niebuhr, A., Henry, T., Goldman, J., Baumgartner, I., van Belle, E., Gerss, J., Hirsch, A.T., and Nikol, S. (2012). Long-term safety of intramuscular gene transfer of non-viral FGF1 for peripheral artery disease. *Gene Ther* 19, 264-270.
- Nikol, S., Baumgartner, I., Van Belle, E., Diehm, C., Visona, A., Capogrossi, M.C., Ferreira-Maldent, N., Gallino, A., Wyatt, M.G., Wijesinghe, L.D., *et al.* (2008). Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol Ther* 16, 972-978.
- Niwano, K., Arai, M., Koitabashi, N., Watanabe, A., Ikeda, Y., Miyoshi, H., and Kurabayashi, M. (2008). Lentiviral vector-mediated SERCA2 gene transfer protects against heart failure and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Mol Ther* 16, 1026-1032.
- Norgren, L., Hiatt, W.R., Dormandy, J.A., Nehler, M.R., Harris, K.A., Fowkes, F.G., Rutherford, R.B., and Group, T.I.W. (2007). Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. *Int Angiol* 26, 81-157.
- O'Brien, T.P., Yang, G.P., Sanders, L., and Lau, L.F. (1990). Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 10, 3569-3577.
- O'Dowd, B.F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H.H., Tsui, L.C., Kennedy, J.L., Shi, X., Petronis, A., George, S.R., and Nguyen, T. (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136, 355-360.
- Ohki, Y., Heissig, B., Sato, Y., Akiyama, H., Zhu, Z., Hicklin, D.J., Shimada, K., Ogawa, H., Daida, H., Hattori, K., *et al.* (2005). Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J* 19, 2005-2007.
- Onimaru, M., Yonemitsu, Y., Tanii, M., Nakagawa, K., Masaki, I., Okano, S., Ishibashi, H., Shirasuna, K., Hasegawa, M., and Sueishi, K. (2002). Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res* 91, 923-930.
- Pacak, C.A., Mah, C.S., Thattaliyath, B.D., Conlon, T.J., Lewis, M.A., Cloutier, D.E., Zolotukhin, I., Tarantal, A.F., and Byrne, B.J. (2006). Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res* 99, e3-9.
- Palace, V.P., Hill, M.F., Farahmand, F., and Singal, P.K. (1999). Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function after myocardial infarction. *Circulation* 99, 121-126.
- Palfi, S., Gurruchaga, J.M., Ralph, G.S., Lepetit, H., Lavis, S., Buttery, P.C., Watts, C., Miskin, J., Kelleher, M., Deeley, S., *et al.* (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 383, 1138-1146.
- Pan, Q., Qin, X., Ma, S., Wang, H., Cheng, K., Song, X., Gao, H., Wang, Q., Tao, R., Wang, Y., *et al.* (2014). Myocardial protective effect of extracellular superoxide dismutase gene modified bone marrow mesenchymal stromal cells on infarcted mice hearts. *Theranostics* 4, 475-486.
- Patan, S. (1998). TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* 56, 1-21.

- Patel, R., Nagueh, S.F., Tsybouleva, N., Abdellatif, M., Lutucuta, S., Kopelen, H.A., Quinones, M.A., Zoghbi, W.A., Entman, M.L., Roberts, R., *et al.* (2001). Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 104, 317-324.
- Paterna, J.C., and Bueler, H. (2002). Recombinant adeno-associated virus vector design and gene expression in the mammalian brain. *Methods* 28, 208-218.
- Pchejetski, D., Foussal, C., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Guilbeau-Frugier, C., Schaak, S., Seguelas, M.H., Wanecq, E., Valet, P., *et al.* (2012). Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur Heart J* 33, 2360-2369.
- Pecher, P., and Schumacher, B.A. (2000). Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical results after 3 years. *Ann Thorac Surg* 69, 1414-1419.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.
- Perbal, B. (2004). CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363, 62-64.
- Periasamy, M., Reed, T.D., Liu, L.H., Ji, Y., Loukianov, E., Paul, R.J., Nieman, M.L., Riddle, T., Duffy, J.J., Doetschman, T., *et al.* (1999). Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J Biol Chem* 274, 2556-2562.
- Perin, E.C., Willerson, J.T., Pepine, C.J., Henry, T.D., Ellis, S.G., Zhao, D.X., Silva, G.V., Lai, D., Thomas, J.D., Kronenberg, M.W., *et al.* (2012). Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA* 307, 1717-1726.
- Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., and Hellen, C.U. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 12, 67-83.
- Philippe, S., Sarkis, C., Barkats, M., Mammeri, H., Ladroue, C., Petit, C., Mallet, J., and Serguera, C. (2006). Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17684-17689.
- Pichavant, C., and Tremblay, J.P. (2012). Generation of lentiviral vectors for use in skeletal muscle research. *Methods Mol Biol* 798, 285-295.
- Pilipenko, E.V., Gmyl, A.P., Maslova, S.V., Svitkin, Y.V., Sinyakov, A.N., and Agol, V.I. (1992). Prokaryotic-like cis elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA. *Cell* 68, 119-131.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Pouchain (2003). La prise en charge du patient insuffisant cardiaque chronique. *Exercer* 66, 1-4.
- Powell, R.J., Comerota, A.J., Berceli, S.A., Guzman, R., Henry, T.D., Tzeng, E., Velazquez, O., Marston, W.A., Bartel, R.L., Longcore, A., *et al.* (2011). Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing

- expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 54, 1032-1041.
- Powers, C.J., McLeskey, S.W., and Wellstein, A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7, 165-197.
- Prats, A.C., Van den Berghe, L., Rayssac, A., Ainaoui, N., Morfoisse, F., Pujol, F., Legonidec, S., Bikfalvi, A., Prats, H., Pyronnet, S., *et al.* (2013). CXCL4L1-fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Microvasc Res* 89, 25-33.
- Prats, H., Kaghad, M., Prats, A.C., Klagsbrun, M., Lelias, J.M., Liauzun, P., Chalon, P., Tauber, J.P., Amalric, F., Smith, J.A., *et al.* (1989). High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1836-1840.
- Preda, M.B., Rosca, A.M., Tutuianu, R., and Burlacu, A. (2015). Pre-stimulation with FGF-2 increases in vitro functional coupling of mesenchymal stem cells with cardiac cells. *Biochem Biophys Res Commun* 464, 667-673.
- Preston, G.A., Zarella, C.S., Pendergraft, W.F., 3rd, Rudolph, E.H., Yang, J.J., Sekura, S.B., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2002). Novel effects of neutrophil-derived proteinase 3 and elastase on the vascular endothelium involve in vivo cleavage of NF-kappaB and proapoptotic changes in JNK, ERK, and p38 MAPK signaling pathways. *J Am Soc Nephrol* 13, 2840-2849.
- Prudovsky, I., Tarantini, F., Landriscina, M., Neivandt, D., Soldi, R., Kirov, A., Small, D., Kathir, K.M., Rajalingam, D., and Kumar, T.K. (2008). Secretion without Golgi. *J Cell Biochem* 103, 1327-1343.
- Prunier, F., Kawase, Y., Gianni, D., Scapin, C., Danik, S.B., Ellinor, P.T., Hajjar, R.J., and Del Monte, F. (2008). Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion. *Circulation* 118, 614-624.
- Pyronnet, S., Pradayrol, L., and Sonenberg, N. (2000). A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5, 607-616.
- Quick, C.R., and Cotton, L.T. (1982). The measured effect of stopping smoking on intermittent claudication. *Br J Surg* 69 Suppl, S24-26.
- Rajagopalan, S., Mohler, E., 3rd, Lederman, R.J., Saucedo, J., Mendelsohn, F.O., Olin, J., Blebea, J., Goldman, C., Trachtenberg, J.D., Pressler, M., *et al.* (2003). Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in peripheral arterial disease: Design of the RAVE trial. *Am Heart J* 145, 1114-1118.
- Rapti, K., Chaanine, A.H., and Hajjar, R.J. (2011). Targeted gene therapy for the treatment of heart failure. *Can J Cardiol* 27, 265-283.
- Rayssac, A. (2010). Vecteurs multicistroniques pro-angiogéniques : une nouvelle stratégie de thérapie génique de l'ischémie critique des membres inférieurs. Thèse déposée le 9 Mars 2010.
- Rayssac, A., Neveu, C., Pucelle, M., Van den Berghe, L., Prado-Lourenco, L., Arnal, J.F., Chaufour, X., and Prats, A.C. (2009). IRES-based vector coexpressing FGF2 and Cyr61 provides synergistic and safe therapeutics of lower limb ischemia. *Mol Ther* 17, 2010-2019.
- Renaud-Gabardos, E., Hantelys, F., Morfoisse, F., Chaufour, X., Garmy-Susini, B., and Prats, A.C. (2015). Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. *World J Exp Med* 5, 11-20.

- Resar, J.R., Roguin, A., Voner, J., Nasir, K., Hennebry, T.A., Miller, J.M., Ingersoll, R., Kasch, L.M., and Semenza, G.L. (2005). Hypoxia-inducible factor 1 α polymorphism and coronary collaterals in patients with ischemic heart disease. *Chest* 128, 787-791.
- Richard, D.E., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275, 26765-26771.
- Rincon, M.Y., VandenDriessche, T., and Chuah, M.K. (2015). Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovasc Res* 108, 4-20.
- Rissanen, T.T., Markkanen, J.E., Gruchala, M., Heikura, T., Puranen, A., Kettunen, M.I., Kholova, I., Kauppinen, R.A., Achen, M.G., Stacker, S.A., *et al.* (2003). VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* 92, 1098-1106.
- Romanelli, M.G., Diani, E., and Lievens, P.M. (2013). New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein. *Int J Mol Sci* 14, 22906-22932.
- Roncalli, J. (2014). An update on primary findings and new designs in biotherapy studies for acute myocardial infarction. *Future Cardiol* 10, 781-788.
- Roncalli, J., Mouquet, F., Piot, C., Trochu, J.N., Le Corvoisier, P., Neuder, Y., Le Tourneau, T., Agostini, D., Gaxotte, V., Sportouch, C., *et al.* (2011). Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur Heart J* 32, 1748-1757.
- Roncalli, J., Tongers, J., and Losordo, D.W. (2010). Update on gene therapy for myocardial ischaemia and left ventricular systolic dysfunction or heart failure. *Arch Cardiovasc Dis* 103, 469-476.
- Rosenblatt-Velin, N., Lepore, M.G., Cartoni, C., Beermann, F., and Pedrazzini, T. (2005). FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest* 115, 1724-1733.
- Rubanyi, G.M. (2013). Mechanistic, technical, and clinical perspectives in therapeutic stimulation of coronary collateral development by angiogenic growth factors. *Mol Ther* 21, 725-738.
- Ruel, M., Laham, R.J., Parker, J.A., Post, M.J., Ware, J.A., Simons, M., and Sellke, F.W. (2002). Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124, 28-34.
- Ruponen, M., Hyvonen, Z., Urtti, A., and Yla-Herttuala, S. (2005). Nonviral gene delivery methods in cardiovascular diseases. *Methods Mol Med* 108, 315-328.
- Rutanen, J., Rissanen, T.T., Markkanen, J.E., Gruchala, M., Silvennoinen, P., Kivela, A., Hedman, A., Hedman, M., Heikura, T., Orden, M.R., *et al.* (2004). Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation* 109, 1029-1035.
- Sabbah, H.N., Sharov, V.G., Gupta, R.C., Todor, A., Singh, V., and Goldstein, S. (2000). Chronic therapy with metoprolol attenuates cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 36, 1698-1705.
- Saigawa, T., Kato, K., Ozawa, T., Toba, K., Makiyama, Y., Minagawa, S., Hashimoto, S., Furukawa, T., Nakamura, Y., Hanawa, H., *et al.* (2004). Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association

- between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J* 68, 1189-1193.
- Saini, U., Gumina, R.J., Wolfe, B., Kuppusamy, M.L., Kuppusamy, P., and Boudoulas, K.D. (2013). Preconditioning mesenchymal stem cells with caspase inhibition and hyperoxia prior to hypoxia exposure increases cell proliferation. *J Cell Biochem* 114, 2612-2623.
- Sakata, S., Lebeche, D., Sakata, Y., Sakata, N., Chemaly, E.R., Liang, L., Nakajima-Takenaka, C., Tsuji, T., Konishi, N., del Monte, F., *et al.* (2007). Transcoronary gene transfer of SERCA2a increases coronary blood flow and decreases cardiomyocyte size in a type 2 diabetic rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1204-1207.
- Sanada, F., Taniyama, Y., Kanbara, Y., Otsu, R., Ikeda-Iwababu, Y., Carracedo, M., Rakugi, H., and Morishita, R. (2015). Gene therapy in peripheral artery disease. *Expert Opin Biol Ther* 15, 381-390.
- Scappaticci, F.A., Smith, R., Pathak, A., Schloss, D., Lum, B., Cao, Y., Johnson, F., Engleman, E.G., and Nolan, G.P. (2001). Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity in vitro and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. *Mol Ther* 3, 186-196.
- Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D.G., Hamm, C.W., *et al.* (2006a). Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, 1210-1221.
- Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D.G., Hamm, C.W., *et al.* (2006b). Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 27, 2775-2783.
- Schepens, B., Tinton, S.A., Bruynooghe, Y., Beyaert, R., and Cornelis, S. (2005). The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1 α IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res* 33, 6884-6894.
- Schober, J.M., Chen, N., Grzeszkiewicz, T.M., Jovanovic, I., Emeson, E.E., Ugarova, T.P., Ye, R.D., Lau, L.F., and Lam, S.C. (2002). Identification of integrin $\alpha(M)\beta(2)$ as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood* 99, 4457-4465.
- Schumacher, B., Stegmann, T., and Pecher, P. (1998). The stimulation of neoangiogenesis in the ischemic human heart by the growth factor FGF: first clinical results. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 39, 783-789.
- Scimia, M.C., Cannavo, A., and Koch, W.J. (2013). Gene therapy for heart disease: molecular targets, vectors and modes of delivery to myocardium. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 11, 999-1013.
- Seeger, F.H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2007). Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 28, 766-772.
- Sekiguchi, H., Li, M., and Losordo, D.W. (2009). The relative potency and safety of endothelial progenitor cells and unselected mononuclear cells for recovery from myocardial infarction and ischemia. *J Cell Physiol* 219, 235-242.

- Senior, R., Kaul, S., and Lahiri, A. (1999). Myocardial viability on echocardiography predicts long-term survival after revascularization in patients with ischemic congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 33, 1848-1854.
- Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.D., Guerquin-Kern, J.L., Lechene, C.P., and Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493, 433-436.
- Shareef, M.A., Anwer, L.A., and Poizat, C. (2014). Cardiac SERCA2A/B: therapeutic targets for heart failure. *Eur J Pharmacol* 724, 1-8.
- Sheikh, A.Y., Chun, H.J., Glassford, A.J., Kundu, R.K., Kutschka, I., Ardigo, D., Hendry, S.L., Wagner, R.A., Chen, M.M., Ali, Z.A., *et al.* (2008). In vivo genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H88-98.
- Sheikh, F., Sontag, D.P., Fandrich, R.R., Kardami, E., and Cattini, P.A. (2001). Overexpression of FGF-2 increases cardiac myocyte viability after injury in isolated mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1039-1050.
- Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofer, S., Ito, M., Liao, R., Colucci, W.S., and Walsh, K. (2005). Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 115, 2108-2118.
- Sia, Y.T., Parker, T.G., Liu, P., Tsoporis, J.N., Adam, A., and Rouleau, J.L. (2002). Improved post-myocardial infarction survival with probucol in rats: effects on left ventricular function, morphology, cardiac oxidative stress and cytokine expression. *J Am Coll Cardiol* 39, 148-156.
- Silvestre, J.S., and Menasche, P. (2015). The Evolution of the Stem Cell Theory for Heart Failure. *EBioMedicine* 2, 1871-1879.
- Silvestre, J.S., Smadja, D.M., and Levy, B.I. (2013). Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiol Rev* 93, 1743-1802.
- Simons, M., Annex, B.H., Laham, R.J., Kleiman, N., Henry, T., Dauerman, H., Udelson, J.E., Gervino, E.V., Pike, M., Whitehouse, M.J., *et al.* (2002). Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 105, 788-793.
- Simons, M., Bonow, R.O., Chronos, N.A., Cohen, D.J., Giordano, F.J., Hammond, H.K., Laham, R.J., Li, W., Pike, M., Sellke, F.W., *et al.* (2000). Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation* 102, E73-86.
- Simper, D., Mayr, U., Urbich, C., Zampetaki, A., Prokopi, M., Didangelos, A., Saje, A., Mueller, M., Benbow, U., Newby, A.C., *et al.* (2010). Comparative proteomics profiling reveals role of smooth muscle progenitors in extracellular matrix production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1325-1332.
- Simpkin, J.C., Yellon, D.M., Davidson, S.M., Lim, S.Y., Wynne, A.M., and Smith, C.C. (2007). Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 102, 518-528.
- Smadja, D., Silvestre, J.S., and Levy, B.I. (2013). [Genic and cellular therapy for peripheral arterial diseases]. *Transfus Clin Biol* 20, 211-220.
- Smadja, D.M., Bieche, I., Helley, D., Laurendeau, I., Simonin, G., Muller, L., Aiach, M., and Gaussem, P. (2007). Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6). *J Cell Mol Med* 11, 1149-1161.

- Song, G., Pacher, M., Balakrishnan, A., Yuan, Q., Tsay, H.C., Yang, D., Reetz, J., Brandes, S., Dai, Z., Putzer, B.M., *et al.* (2016). Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes In Vivo Attenuates Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* **18**, 797-808.
- Spriggs, K.A., Bushell, M., Mitchell, S.A., and Willis, A.E. (2005). Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ* **12**, 585-591.
- Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skaliter, R., Grossman, Z., and Keshet, E. (1998). Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* **18**, 3112-3119.
- Stewart, D.J., Hilton, J.D., Arnold, J.M., Gregoire, J., Rivard, A., Archer, S.L., Charbonneau, F., Cohen, E., Curtis, M., Buller, C.E., *et al.* (2006). Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther* **13**, 1503-1511.
- Stewart, D.J., Kutryk, M.J., Fitchett, D., Freeman, M., Camack, N., Su, Y., Della Siega, A., Bilodeau, L., Burton, J.R., Proulx, G., *et al.* (2009). VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Mol Ther* **17**, 1109-1115.
- Stewart, H.J., Fong-Wong, L., Strickland, I., Chipchase, D., Kelleher, M., Stevenson, L., Thoree, V., McCarthy, J., Ralph, G.S., Mitrophanous, K.A., *et al.* (2011). A stable producer cell line for the manufacture of a lentiviral vector for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* **22**, 357-369.
- Stoneley, M., Paulin, F.E., Le Quesne, J.P., Chappell, S.A., and Willis, A.E. (1998). C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* **16**, 423-428.
- Strauer, B.E., Brehm, M., Zeus, T., Kosterling, M., Hernandez, A., Sorg, R.V., Kogler, G., and Wernet, P. (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* **106**, 1913-1918.
- Strauer, B.E., Yousef, M., and Schannwell, C.M. (2010). The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *Eur J Heart Fail* **12**, 721-729.
- Symes, J.F. (2001). Gene therapy for ischemic heart disease: therapeutic potential. *Am J Cardiovasc Drugs* **1**, 159-166.
- Szokodi, I., Tavi, P., Foldes, G., Voutilainen-Myllyla, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piihola, J., Rysa, J., Toth, M., *et al.* (2002). Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* **91**, 434-440.
- Tahara, H., Zitvogel, L., Storkus, W.J., Zeh, H.J., 3rd, McKinney, T.G., Schreiber, R.D., Gubler, U., Robbins, P.D., and Lotze, M.T. (1995). Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *J Immunol* **154**, 6466-6474.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Wagner, M., Isner, J.M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* **5**, 434-438.
- Tamarat, R., Silvestre, J.S., Durie, M., and Levy, B.I. (2002). Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Lab Invest* **82**, 747-756.

- Tang, X.L., Rokosh, G., Sanganalmath, S.K., Yuan, F., Sato, H., Mu, J., Dai, S., Li, C., Chen, N., Peng, Y., *et al.* (2010). Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation* 121, 293-305.
- Tao, Z., Chen, B., Tan, X., Zhao, Y., Wang, L., Zhu, T., Cao, K., Yang, Z., Kan, Y.W., and Su, H. (2011). Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2064-2069.
- Tardieu, M., Zerah, M., Husson, B., de Bournonville, S., Deiva, K., Adamsbaum, C., Vincent, F., Hocquemiller, M., Broissand, C., Furlan, V., *et al.* (2014). Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum Gene Ther* 25, 506-516.
- Tashiro, Y., Nishida, C., Sato-Kusubata, K., Ohki-Koizumi, M., Ishihara, M., Sato, A., Gritli, I., Komiyama, H., Sato, Y., Dan, T., *et al.* (2012). Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice. *Blood* 119, 6382-6393.
- Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., *et al.* (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 427-435.
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., *et al.* (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 471-476.
- Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M.X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., and Fujimiya, M. (2001). The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 99, 87-92.
- Teraa, M., Sprengers, R.W., Schutgens, R.E., Slaper-Cortenbach, I.C., van der Graaf, Y., Algra, A., van der Tweel, I., Doevendans, P.A., Mali, W.P., Moll, F.L., *et al.* (2015). Effect of repetitive intra-arterial infusion of bone marrow mononuclear cells in patients with no-option limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled Rejuvenating Endothelial Progenitor Cells via Transcutaneous Intra-arterial Supplementation (JUVENTAS) trial. *Circulation* 131, 851-860.
- Teraa, M., Sprengers, R.W., van der Graaf, Y., Peters, C.E., Moll, F.L., and Verhaar, M.C. (2013). Autologous bone marrow-derived cell therapy in patients with critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Ann Surg* 258, 922-929.
- Thakor, N., and Holcik, M. (2012). IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2alpha- independent manner during stress. *Nucleic Acids Res* 40, 541-552.
- Thum, T., Hoeber, S., Froese, S., Klink, I., Stichtenoth, D.O., Galuppo, P., Jakob, M., Tsikas, D., Anker, S.D., Poole-Wilson, P.A., *et al.* (2007). Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ Res* 100, 434-443.

- Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., and Kessler, P.D. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-98.
- Tse, H.F., Siu, C.W., Zhu, S.G., Songyan, L., Zhang, Q.Y., Lai, W.H., Kwong, Y.L., Nicholls, J., and Lau, C.P. (2007). Paracrine effects of direct intramyocardial implantation of bone marrow derived cells to enhance neovascularization in chronic ischaemic myocardium. *Eur J Heart Fail* 9, 747-753.
- Tseng, A.H., Shieh, S.S., and Wang, D.L. (2013). SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 63, 222-234.
- Tysome, J.R., Wang, P., Alusi, G., Briat, A., Gangeswaran, R., Wang, J., Bhakta, V., Fodor, I., Lemoine, N.R., and Wang, Y. (2011). Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin-angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther* 22, 1101-1108.
- Udelson, J.E., Dilsizian, V., Laham, R.J., Chronos, N., Vansant, J., Blais, M., Galt, J.R., Pike, M., Yoshizawa, C., and Simons, M. (2000). Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease. *Circulation* 102, 1605-1610.
- Unger, E.F., Goncalves, L., Epstein, S.E., Chew, E.Y., Trapnell, C.B., Cannon, R.O., 3rd, and Quyyumi, A.A. (2000). Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 85, 1414-1419.
- Urbich, C., and Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95, 343-353.
- Vagner, S., Gensac, M.C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H., and Prats, A.C. (1995a). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol Cell Biol* 15, 35-44.
- Vagner, S., Waysbort, A., Marenda, M., Gensac, M.C., Amalric, F., and Prats, A.C. (1995b). Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor. *J Biol Chem* 270, 20376-20383.
- Vale, P.R., Isner, J.M., and Rosenfield, K. (2001). Therapeutic angiogenesis in critical limb and myocardial ischemia. *J Interv Cardiol* 14, 511-528.
- van der Laan, A.M., Piek, J.J., and van Royen, N. (2009). Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI. *Nat Rev Cardiol* 6, 515-523.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 700-714.
- Vandendriessche, T., and Chuah, M.K. (2013). Targeting endothelial cells by gene therapy. *Blood* 122, 1993-1994.
- Vassalli, G., Bueler, H., Dudler, J., von Segesser, L.K., and Kappenberger, L. (2003). Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: a comparative study with adenovirus vectors. *Int J Cardiol* 90, 229-238.
- Vera Janavel, G.L., De Lorenzi, A., Cortes, C., Olea, F.D., Cabeza Meckert, P., Bercovich, A., Criscuolo, M., Laguens, R., and Crottogini, A. (2012). Effect of vascular endothelial growth factor gene transfer on infarct size, left ventricular function and myocardial

- perfusion in sheep after 2 months of coronary artery occlusion. *J Gene Med* 14, 279-287.
- Walgenbach, K.J., Gratas, C., Shestak, K.C., and Becker, D. (1995). Ischaemia-induced expression of bFGF in normal skeletal muscle: a potential paracrine mechanism for mediating angiogenesis in ischaemic skeletal muscle. *Nat Med* 1, 453-459.
- Walter, D.H., Krankenberg, H., Balzer, J.O., Kalka, C., Baumgartner, I., Schluter, M., Tonn, T., Seeger, F., Dimmeler, S., Lindhoff-Last, E., *et al.* (2011). Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA). *Circ Cardiovasc Interv* 4, 26-37.
- Wang, L., Pasha, Z., Wang, S., Li, N., Feng, Y., Lu, G., Millard, R.W., and Ashraf, M. (2013). Protein kinase G1 alpha overexpression increases stem cell survival and cardiac function after myocardial infarction. *PLoS One* 8, e60087.
- Wang, Z., Allen, J.M., Riddell, S.R., Gregorevic, P., Storb, R., Tapscott, S.J., Chamberlain, J.S., and Kuhr, C.S. (2007). Immunity to adeno-associated virus-mediated gene transfer in a random-bred canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 18, 18-26.
- Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Li, J., and Xiao, X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* 23, 321-328.
- Wang, Z.X., Li, D., Cao, J.X., Liu, Y.S., Wang, M., Zhang, X.Y., Li, J.L., Wang, H.B., Liu, J.L., and Xu, B.L. (2014). Efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy in patients with peripheral arterial disease. *J Atheroscler Thromb* 21, 1183-1196.
- Warnock, J.N., Daigre, C., and Al-Rubeai, M. (2011). Introduction to viral vectors. *Methods Mol Biol* 737, 1-25.
- Wasala, N.B., Shin, J.H., and Duan, D. (2011). The evolution of heart gene delivery vectors. *J Gene Med* 13, 557-565.
- Watanabe, E., Smith, D.M., Sun, J., Smart, F.W., Delcarpio, J.B., Roberts, T.B., Van Meter, C.H., Jr., and Claycomb, W.C. (1998). Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic Res Cardiol* 93, 30-37.
- Wen, X.Y., Mandelbaum, S., Li, Z.H., Hitt, M., Graham, F.L., Hawley, T.S., Hawley, R.G., and Stewart, A.K. (2001). Tricistronic viral vectors co-expressing interleukin-12 (1L-12) and CD80 (B7-1) for the immunotherapy of cancer: preclinical studies in myeloma. *Cancer Gene Ther* 8, 361-370.
- Wencker, D., Chandra, M., Nguyen, K., Miao, W., Garantziotis, S., Factor, S.M., Shirani, J., Armstrong, R.C., and Kitsis, R.N. (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 111, 1497-1504.
- Williams, P.D., Ranjzad, P., Kakar, S.J., and Kingston, P.A. (2010). Development of viral vectors for use in cardiovascular gene therapy. *Viruses* 2, 334-371.
- Winner, L.K., Beard, H., Hassiotis, S., Lau, A.A., Luck, A.J., Hopwood, J.J., and Hemsley, K.M. (2016). A Preclinical Study Evaluating AAVrh10-Based Gene Therapy for Sanfilippo Syndrome. *Hum Gene Ther* 27, 363-375.
- Wolf, N., Yang, W., Dunk, C.E., Gashaw, I., Lye, S.J., Ring, T., Schmidt, M., Winterhager, E., and Gellhaus, A. (2010). Regulation of the matricellular proteins CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) by hypoxia-inducible factor-1{alpha} and transforming-growth factor-{beta}3 in the human trophoblast. *Endocrinology* 151, 2835-2845.
- Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., *et al.* (2004). Intracoronary autologous

- bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* **364**, 141-148.
- Wray, D.W., Amann, M., and Richardson, R.S. (2016). Peripheral vascular function, oxygen delivery and utilization: the impact of oxidative stress in aging and heart failure with reduced ejection fraction. *Heart Fail Rev*.
- Wu, K.C., Weiss, R.G., Thiemann, D.R., Kitagawa, K., Schmidt, A., Dalal, D., Lai, S., Bluemke, D.A., Gerstenblith, G., Marban, E., *et al.* (2008). Late gadolinium enhancement by cardiovascular magnetic resonance heralds an adverse prognosis in nonischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **51**, 2414-2421.
- Xu, B., Luo, Y., Liu, Y., Li, B.Y., and Wang, Y. (2015). Platelet-derived growth factor-BB enhances MSC-mediated cardioprotection via suppression of miR-320 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **308**, H980-989.
- Yan, A.T., Shayne, A.J., Brown, K.A., Gupta, S.N., Chan, C.W., Luu, T.M., Di Carli, M.F., Reynolds, H.G., Stevenson, W.G., and Kwong, R.Y. (2006). Characterization of the per-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality. *Circulation* **114**, 32-39.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242-248.
- Yanez-Munoz, R.J., Balaggan, K.S., MacNeil, A., Howe, S.J., Schmidt, M., Smith, A.J., Buch, P., MacLaren, R.E., Anderson, P.N., Barker, S.E., *et al.* (2006). Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* **12**, 348-353.
- Yang, G.P., and Lau, L.F. (1991). Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ* **2**, 351-357.
- Yi, Y., Noh, M.J., and Lee, K.H. (2011). Current advances in retroviral gene therapy. *Curr Gene Ther* **11**, 218-228.
- Yla-Herttuala, S. (2015). Gene Therapy for Heart Failure: Back to the Bench. *Mol Ther* **23**, 1551-1552.
- Yonemitsu, Y., Matsumoto, T., Itoh, H., Okazaki, J., Uchiyama, M., Yoshida, K., Onimaru, M., Onohara, T., Inoguchi, H., Kyuragi, R., *et al.* (2013). DVC1-0101 to treat peripheral arterial disease: a Phase I/IIa open-label dose-escalation clinical trial. *Mol Ther* **21**, 707-714.
- Yoon, C.H., Hur, J., Park, K.W., Kim, J.H., Lee, C.S., Oh, I.Y., Kim, T.Y., Cho, H.J., Kang, H.J., Chae, I.H., *et al.* (2005). Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* **112**, 1618-1627.
- Yoshida, Y., Togi, K., Matsumae, H., Nakashima, Y., Kojima, Y., Yamamoto, H., Ono, K., Nakamura, T., Kita, T., and Tanaka, M. (2007). CCN1 protects cardiac myocytes from oxidative stress via beta1 integrin-Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **355**, 611-618.
- You, J.J., Yang, C.M., Chen, M.S., and Yang, C.H. (2010). Regulation of Cyr61/CCN1 expression by hypoxia through cooperation of c-Jun/AP-1 and HIF-1alpha in retinal vascular endothelial cells. *Exp Eye Res* **91**, 825-836.
- Yu, S., Feng, X., Shu, T., Matano, T., Hasegawa, M., Wang, X., Ma, H., Li, H., Li, Z., and Zeng, Y. (2008). Potent specific immune responses induced by prime-boost-boost strategies based on DNA, adenovirus, and Sendai virus vectors expressing gag gene of Chinese HIV-1 subtype B. *Vaccine* **26**, 6124-6131.

- Zeng, H., He, X., Hou, X., Li, L., and Chen, J.X. (2014). Apelin gene therapy increases myocardial vascular density and ameliorates diabetic cardiomyopathy via upregulation of sirtuin 3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H585-597.
- Zeng, X., Yu, S.P., Taylor, T., Ogle, M., and Wei, L. (2012). Protective effect of apelin on cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells against apoptosis. *Stem Cell Res* 8, 357-367.
- Zeng, X.J., Zhang, L.K., Wang, H.X., Lu, L.Q., Ma, L.Q., and Tang, C.S. (2009). Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides* 30, 1144-1152.
- Zeng, X.X., Wilm, T.P., Sepich, D.S., and Solnica-Krezel, L. (2007). Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrulation. *Dev Cell* 12, 391-402.
- Zhang, C., Wang, K.Z., Qiang, H., Tang, Y.L., Li, Q., Li, M., and Dang, X.Q. (2010). Angiopoiesis and bone regeneration via co-expression of the hVEGF and hBMP genes from an adeno-associated viral vector in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin* 31, 821-830.
- Zhang, J.C., Zheng, G.F., Wu, L., Ou Yang, L.Y., and Li, W.X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing human basic fibroblast growth factor increase vasculogenesis in ischemic rats. *Braz J Med Biol Res* 47, 886-894.
- Zhao, J., Pettigrew, G.J., Thomas, J., Vandenberg, J.I., Delriviere, L., Bolton, E.M., Carmichael, A., Martin, J.L., Marber, M.S., and Lever, A.M. (2002). Lentiviral vectors for delivery of genes into neonatal and adult ventricular cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 97, 348-358.
- Zhao, T., Zhao, W., Chen, Y., Ahokas, R.A., and Sun, Y. (2011). Acidic and basic fibroblast growth factors involved in cardiac angiogenesis following infarction. *Int J Cardiol* 152, 307-313.
- Zhou, B., and Pu, W.T. (2011). Epicardial epithelial-to-mesenchymal transition in injured heart. *J Cell Mol Med* 15, 2781-2783.
- Ziaeian, B., and Fonarow, G.C. (2016). Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 13, 368-378.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., Koch, W.J., and Rabinowitz, J.E. (2010). Comparative cardiac gene delivery of adeno-associated virus serotypes 1-9 reveals that AAV6 mediates the most efficient transduction in mouse heart. *Clin Transl Sci* 3, 81-89.
- Zitvogel, L., Tahara, H., Cai, Q., Storkus, W.J., Muller, G., Wolf, S.F., Gately, M., Robbins, P.D., and Lotze, M.T. (1994). Construction and characterization of retroviral vectors expressing biologically active human interleukin-12. *Hum Gene Ther* 5, 1493-1506.
- Zouggar, Y., Ait-Oufella, H., Bonnin, P., Simon, T., Sage, A.P., Guerin, C., Vilar, J., Caligiuri, G., Tsiantoulas, D., Laurans, L., *et al.* (2013). B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med* 19, 1273-1280.
- Zsebo, K., Yaroshinsky, A., Rudy, J.J., Wagner, K., Greenberg, B., Jessup, M., and Hajjar, R.J. (2014). Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circ Res* 114, 101-108.

Annexes



Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy

Edith Renaud-Gabardos, Fransky Hantelys, Florent Morfoisse, Xavier Chaufour, Barbara Garmy-Susini, Anne-Catherine Prats

Edith Renaud-Gabardos, Fransky Hantelys, Anne-Catherine Prats, Université de Toulouse, UPS, TRADGENE, EA4554, BP 84225, F-31432 Toulouse, France

Florent Morfoisse, Barbara Garmy-Susini, Inserm, U1048, F-31432 Toulouse, France and Université de Toulouse, UPS, I2MC, F-31432 Toulouse, France

Xavier Chaufour, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, F-31059 Toulouse and Université de Toulouse, UPS, TRADGENE, EA4554, BP 84225, F-31432 Toulouse, France

Author contributions: Renaud-Gabardos E, Hantelys F, Morfoisse F, Chaufour X, Garmy-Susini B and Prats AC contributed to paper writing.

Conflict-of-interest: The authors declare they have no conflicting interests (including but not limited to commercial, personal, political, intellectual, or religious interests) related to the present work.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Correspondence to: Anne-Catherine Prats, PhD, Université de Toulouse, UPS, TRADGENE, EA 4554, I2MC, 1, Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, F-31432 Toulouse, France. anne-catherine.prats@inserm.fr

Telephone: +33-53-1224083

Fax: +33-56-1325622

Received: October 18, 2014

Peer-review started: October 18, 2014

First decision: November 20, 2014

Revised: December 8, 2014

Accepted: December 18, 2014

Article in press: December 19, 2014

Published online: February 20, 2015

Abstract

Gene therapy appears as a promising strategy to treat

incurable diseases. In particular, combined gene therapy has shown improved therapeutic efficiency. Internal ribosome entry sites (IRESs), RNA elements naturally present in the 5' untranslated regions of a few mRNAs, constitute a powerful tool to co-express several genes of interest. IRESs are translational enhancers allowing the translational machinery to start protein synthesis by internal initiation. This feature allowed the design of multi-cistronic vectors expressing several genes from a single mRNA. IRESs exhibit tissue specificity, and drive translation in stress conditions when the global cell translation is blocked, which renders them useful for gene transfer in hypoxic conditions occurring in ischemic diseases and cancer. IRES-based viral and non viral vectors have been used successfully in preclinical and clinical assays of combined gene therapy and resulted in therapeutic benefits for various pathologies including cancers, cardiovascular diseases and degenerative diseases.

Key words: Vector; Gene transfer; Internal ribosome entry site; Gene therapy

© The Author(s) 2015. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Combined gene therapy has emerged for a few years as a promising strategy to improve treatments of many diseases including cancer, cardiovascular diseases and degenerative diseases. In this context, internal ribosome entry site (IRES)-based vectors provide a powerful system to co-express several therapeutic genes from the same transcription unit. IRESs are translational enhancers, exhibiting tissue-specificity, and activated by stress. Different IRES-based vectors including plasmids, adeno-associated virus-derived and lentiviral vectors have been used successfully in many preclinical protocols of gene therapy. Moreover the few clinical assays launched with IRES-based multicistronic vectors resulted in therapeutic benefits.

Renaud-Gabardos E *et al.* IRES-based vectors for gene therapy

Renaud-Gabardos E, Hantelys F, Morfesse F, Chautour X, Garmy-Susini B, Prats AC. Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. *World J Exp Med* 2015; 5(1): 11-20. Available from: URL: <http://www.wjnet.com/2220-315X/full/v5/i1/11.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.5493/wjem.v5.i1.11>

INTRODUCTION

Combined gene therapy has appeared for a few years as an attractive approach to optimize the therapeutic benefits of gene transfer. In the field of cancer, the first examples of antitumoral cooperative effect have been provided by co-expression of the co-stimulation molecules CD70 and CD80, and of the two anti-angiogenic factors, angiostatin and endostatin, respectively^[1-3]. Synergistical effects have also been obtained with co-expression of angiogenic growth factors generating therapeutic angiogenesis in ischemic diseases. This rational has been proven first with co-administration of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and angiopoietin as recombinant proteins as well as by co-administration of two plasmids coding these growth factors^[4]. A few years later, combination of recombinant fibroblast growth factor 2 (FGF2) and PDGF-B also improved hindlimb ischemia in rats whereas a bicistronic vector expressing FGF2 and VEGFA efficiently induced vessel formation in a mouse angiogenesis assay^[5]. These studies launched the concept of combined biotherapy. They also revealed that combined gene therapy is a promising therapeutic approach, allowing long term efficiency of treatments compared to recombinant proteins whose half life is often very short.

Internal ribosome entry sites (IRESs) are translational enhancers naturally present in a series of mRNAs, mediating internal initiation of translation when present between the genes of interest (Figure 1). IRESs thus allow the design of multicistronic expression cassettes resembling bacterial operons, able to drive translation of several genes coded by the same mRNA^[6]. We have demonstrated that the use of IRES-based vectors co-expressing two genes of interest allows stable transgene expression with a constant ratio of the proteins of interest, in contrast to the use of two different plasmids expressing each transgene^[7]. Actually, a bicistronic IRES-based vector co-expressing FGF2 and Cyr61 has revealed more efficient to generate therapeutic angiogenesis at low doses than the monocistronic vectors expressing large amounts of only one of these angiogenic factors^[8]. It must be underlined that the IRES-based vector had no side effects on promotion of tumoral angiogenesis in contrast to the monocistronic ones, a very important feature for increased safety in clinical assays. These observations prompted us to deepen the features of IRESs applicable to vectorology and assess progress made in the field of gene transfer and combined gene therapy clinical assays using IRES-based vectors.

IRES, TRANSLATIONAL ACTIVATORS FOR COMBINED TRANSGENE EXPRESSION

At a time when it was admitted that initiation of translation in eukaryotes required recognition of the capped mRNA 5' end to recruit ribosomes, translation of the uncapped picornavirus mRNAs from an internal start codon remained a mystery. Indeed, the so-called ribosome scanning mechanism predicted that ribosomes bound to the mRNA 5' end scanned the mRNA molecules until they recognized an AUG codon^[9,10] (Figure 1). The event of internal ribosome binding was thought impossible. This puzzle raised by picornaviruses was solved by the discovery of RNA elements, called IRES, present in the 5' untranslated regions of their mRNAs, which allow internal recruitment of ribosomes^[11-16]. The dogma of the scanning mechanism was thus broken. In addition, it was quickly extended to cellular mRNAs as the first cellular IRES was discovered three years later in the BiP mRNA, coding for the immunoglobulin chaperone also known as GRP78^[17]. This discovery was followed by the finding of several other IRESs in cellular mRNAs, in particular in the mRNAs of angiogenic growth factors such as FGF2, proto-oncogenes such as c-myc, pro and anti-apoptotic proteins such as X chromosome-linked inhibitor-of-apoptosis protein and apoptotic peptidase activating factor 1^[18-21]. IRESs were also found in retroviruses, whose mRNAs are capped as cellular mRNAs, leading to the design of IRES-containing retroviral vectors^[22-23].

The existence of IRESs in capped cellular mRNAs asked the question of their pathophysiological function^[24]. Actually, several reports showed that IRESs from cellular mRNAs are regulated in various physiological processes including cell differentiation, spermatogenesis, neurone plasticity^[25-27]. Several IRESs are also activated during cell cycle mitosis^[28,29]. Recent reports have also shown that IRESs are aberrantly activated in tumor cells, and are thus involved in dysregulation of gene expression in cancer^[30]. Furthermore, cellular IRES activity is stimulated in stress conditions such as apoptosis and hypoxia when cap-dependent translation is blocked^[31,32].

IRES-dependent internal initiation of translation reminds the prokaryotic initiation mechanism which can translate polycistronic mRNAs^[33-36]. This observation gave the idea that such operons could be created in eukaryotes using IRESs to design expression vectors^[37]. A large majority of expression vectors allow co-expression of two genes under the control of two promoters. However such an approach has revealed that one of the genes may be silenced despite of the expression of the other one even though it expresses an antibiotic^[38]. This can result from competition between the two promoters or counterselection of the gene of interest in case of toxicity or of cell growth inhibition. In such a context, IRESs have been used to generate transgene co-expression under the control of a single promoter (Figure 2).

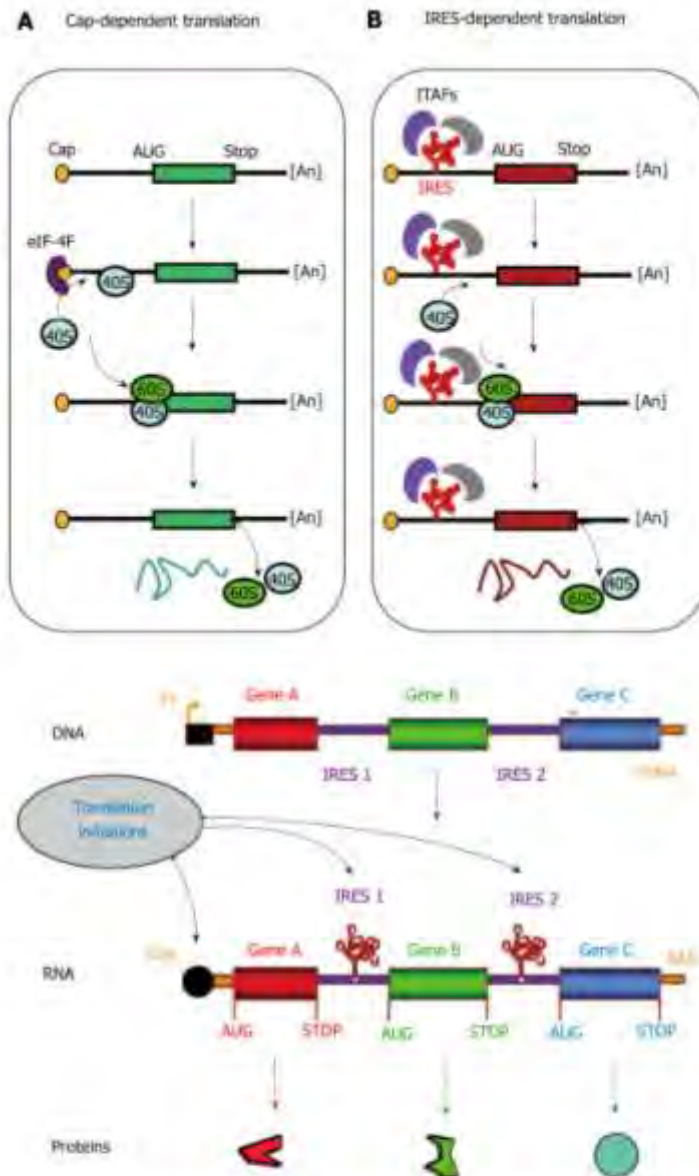


Figure 1 Cap-dependent and internal ribosome entry site-dependent initiation, two alternative mechanisms of translation. A: The so-called cap-dependent ribosome scanning mechanism predicts that ribosome 40S subunit binds to the mRNA 5' end. Ribosome binding requires the initiation factor 4F (eIF-4F, composed of the three proteins eIF-4E, -4A and -4G). Then the mRNA is unwound under the control of the helicases eIF-4A and -4B, allowing the ribosome to scan the mRNA until recognition of an initiation codon (classically AUG)^[17,18]. B: When an internal ribosome entry site (IRES) is present in the mRNA 5' untranslated region, IRES trans-acting factors (ITAFs) allow ribosome 40S internal recruitment, independently of the presence of cap and eIF-4F. The IRES-dependent mechanism occurs in the case of picornavirus uncapped mRNAs as well as for cellular capped mRNAs.

Figure 2 Internal ribosome entry site-based multicistronic vector concept. The internal ribosome entry site (IRES)-based expression cassette contains several genes, separated by IRESs, under the control of the same promoter (Pr). This transcription unit gives rise to a single mRNA coding the different genes. Translation initiation occurs at the 5' end by the cap-dependent mechanism, resulting in translation of the first open reading frame (ORF, Gene A). Internal initiations of translation occur at each IRES, resulting in translation of the other ORFs (Genes B and C). Thus the multicistronic mRNA generates several proteins from a single transcription unit, allowing more stable long term expression and stable transgene ratio^[19]. For each ORF, initiation (AUG) and termination (STOP) codons are indicated.

The first retroviral tricistronic IRES-based vector appeared in 1992, providing an exciting potential for gene therapy^[20]. This vector successfully co-expressed adenosine deaminase with neomycin (NEO) resistance and chloramphenicol acetyltransferase reporter genes, using the two picornavirus IRESs from poliovirus and encephalomyocarditis virus (EMCV), respectively. Two years later, a therapeutic tricistronic vector expressing the two interleukin-12 subunits with NEO validated the concept of IRES-based vectors to co-express two subunits of a protein with an adequate stoichiometry together with a resistance gene^[21]. In the following years, bicistronic vectors were used successfully to select cell clones expressing a protein of interest with a resistance gene, preventing the problems generated by the use of two promoters^[10,22].

TISSUE-SPECIFICITY OF CELLULAR IRESS

Most IRES-based vectors developed up to now use picornavirus IRESs, based on the strong efficiency of such IRESs in transient transfection, compared to cellular IRESs. It has been observed that cellular IRESs often exhibit a low efficiency in transiently transfected cells. Such a feature may result from the cell and tissue specificity of the cellular IRES activities. Actually, the FGF2 IRES activity varies with the cell type, the lowest being in fibroblasts, and the highest in neuroblastoma and osteosarcoma cells^[19]. Similar variations have been observed for other cellular IRESs^[23] (Creancier I. and Prats AC, unpublished results). The strongest regulation

of cellular IRESs has been shown *in vivo*, in transgenic mice expressing bicistronic dual luciferase constructs containing different IRESs. Clearly, the EMCV IRES was active in most tissues and organs, while the FGF2 IRES was very low in most organs except for testis and brain where its activity increased 200 to 400 times, at least 10 times higher than the EMCV IRES activity^[49]. A similar behavior was observed with other cellular IRESs such as c-myc and VEGFA IRESs^[13,47].

The tissue-specific features of cellular IRESs are useful to control transgene expression. Thus they can be considered as translational enhancers, if one makes a parallel with transcriptional enhancers upstream of promoters, governing the tissue-specificity of gene expression. The concept of translational tissue-specificity may be applied to gene transfer by coupling tissue-specific IRESs with tissue-specific promoters to create vectors with increased safety. This concept should also remember us that EMCV is not always the best IRES to be used. A recent study reports the failure of expression of the second cistron of a bicistronic adeno-associated virus (AAV) vector using the EMCV IRES, in murine cerebellar Purkinje neurons^[61].

The advantage of using a cellular IRES has also been demonstrated for gene transfer into skeletal muscle. The FGF1 IRES is as efficient as the EMCV IRES in mouse muscle after plasmid DNA electroporation^[62]. Moreover, when this IRES is used in a bicistronic AAV vector, its activity is significantly superior to that of the EMCV IRES in myoblasts and allows a transgene expression 10 times more efficient when this AAV is injected in mouse muscle^[63]. Such a difference may be due to the presence of specific FGF1 IRES trans-acting factors (TTAFs) (Ainaoui *et al.*, in revision). Alternatively, it can result from the lower ability of the EMCV IRES to maintain a stable long term compared to cellular IRESs, shown in a previous report^[6].

On the basis of these different data, it can be recommended to choose the adequate IRES to be used according to the cell type or tissue to be targeted, rather than using systematically the EMCV IRES as presently proposed in all commercial IRES-based vectors.

IRES-MEDIATED GENE EXPRESSION IN STRESS CONDITIONS

In many diseases cells are subjected to different stresses such as hypoxia, apoptosis or ER stress. In stress conditions, translation initiation is inhibited by two ways: blockade the mammalian target of rapamycin pathway which affects ribosome recruitment on the cap, and phosphorylation of eIF2- α which prevents charged initiator Met-tRNA formation. Interestingly, IRES-dependent translation is not affected by these two ways of silencing^[16,41,64].

As mentioned above, IRESs are naturally present in messenger RNAs coding for proteins involved in the stress response, especially apoptosis and hypoxia. In particular, an IRES is present in the mRNA of the hypoxia-induced factor

1 α (HIF1 α), the key of the cell response to hypoxia that induces transcription of all the genes containing a hypoxia responsive element (HRE) in their promoters^[65]. This IRES allows HIF mRNA translation to be activated during hypoxia despite of the blockade of global translation^[13,65]. Such activation occurs under the control of an ITAF, the pyrimidine tract binding protein, also known as a regulator for various IRESs^[13,18].

An important consequence of hypoxia is the stimulation of angiogenesis in order to generate new vessels able to restore the cell supply with oxygen. This process occurs in cancers when cells in the tumor core are oxygen deprived, as well as in ischemic diseases such as heart and lower limb ischemia when tissues are not any more irrigated due to artery occlusion. Strikingly, the major angiogenic factors VEGFA (vascular endothelial growth factor A), FGF1 and FGF2, possess IRESs in their mRNAs^[23,47,34,36]. VEGFA expression, transcriptionally induced by HIF1 α , is also translationally enhanced *via* the IRES in hypoxic tumors and in ischemic mouse legs^[13,32,34]. In contrast to VEGFA, FGF2 is not induced transcriptionally by hypoxia but its synthesis is translationally induced by the IRES-dependent mechanism in ischemic tissues^[13,31]. The same phenomenon has been observed for the major lymphangiogenic factor VEGFC, induced by hypoxia at the translational level *via* an IRES, but not at the transcriptional level, in tumors and lymph nodes^[16,37]. FGF2 and VEGFC induction is exclusively translational and HIF-independent, revealing that IRESs provide an alternative HIF-independent way of response to hypoxia.

On a biotechnological point of view, the sensitivity of IRESs to hypoxia may be an advantage for several applications. Gene transfer vectors can benefit from this feature as the presence of IRESs allows increased transgene expression in ischemic conditions *in vivo*. Once again, one can see that data from basic research have to be taken into account in the design of optimized expression cassettes. The use of IRES-based vectors seems particularly adequate for gene therapy of ischemic diseases and cancer, as in both cases the transgenes have to be expressed in hypoxic conditions.

BIOMEDICAL APPLICATIONS OF IRESS

IRESs have found biomedical applications for several years. As mentioned above, the first biomedical use of IRESs in an expression vector has been co-expression of subunits of a therapeutic protein with a gene of resistance, as shown for interleukin 12 subunits with a gene of resistance^[30]. However this application is limited to therapeutic genes composed of several subunits. In addition, the use of resistance genes is not recommended as it may prevent the use of the vector in a clinical assay.

Another application of IRESs raised during the last decade, resulting from the emerging concept of combined gene therapy. Several studies have validated this concept using a cocktail of two vectors to transfer two genes simultaneously. This has been particularly

Table 1. Preclinical studies of combined gene therapy with co-administration of monocistronic vectors.

Pathology	Therapeutic genes	Animal model	Vector type	Ref.
Cancers				
Leukemia, melanoma	Angiostatin + endostatin	Mouse	Retrovirus	Scappaticci et al ¹⁰ , 2003
Ovarian cancer	Angiostatin + endostatin	Mouse	AAV	Ponnazhagan et al ¹¹ , 2004
Glioblastoma	VEGF-E1 + angio-endo (Stat1A)	Mouse	SB transposon	Chilless et al ¹² , 2005
Pancreatic cancer	TSPT + endostatin	Mouse	AAV	Zhang et al ¹³ , 2007
Cardiovascular diseases				
Limb ischemia	VEGFA + angiopoietin-1	Rabbit	Plasmid	Chae et al ¹⁴ , 2000
Limb ischemia	VEGFA + FGF2	Mouse	Plasmid	Lee et al ¹⁵ , 2007
Limb ischemia	VEGFA + PDGFB	Rabbit	AAV	Kupatt et al ¹⁶ , 2010
Heart ischemia	VEGFA + PDGFB	Pig	AAV	Kupatt et al ¹⁶ , 2010
Rare diseases				
DMD	Microdystrophin + IGF1	Mouse	AAV	Almouy et al ¹⁷ , 2005

DMD: Duchenne muscular dystrophy; VEGF: Vascular endothelial growth factor; FGF2: Fibroblast growth factor 2; AAV: Adeno-associated virus.

documented in the field of cardiovascular diseases and cancer, with therapeutic benefits obtained in different animal models using different combinations of angiogenic or anti-angiogenic factors^{14,15,16,17} (Table 1). Interestingly the combination of VEGFA and PDGFB successfully induced therapeutic angiogenesis both in ischemic leg and in ischemic heart. In the field of rare diseases, two AAV vectors expressing microdystrophin and IGF1 resulted in increased muscle mass and strength, reduced myofiber degeneration and increased protection against contraction-induced injury in *mdx* mice¹⁸. These different studies were performed either with naked DNA or with recombinant adeno-associated virus vectors.

The use of two different vectors for multiple transgene expression exhibits disadvantages: on the one hand, the ratio of the therapeutic molecules cannot be controlled, leading in the loss of the cooperative effect: expressions of one of the vectors often decrease or is silenced earlier than the other one¹⁹. On the other hand, the cost of two therapeutic vectors in a clinical perspective is higher than a single one. These disadvantages are still more important in case of a cocktail of three or more therapeutic genes.

The concept of IRES-based vectors for combined gene therapy has been validated for combined immunotherapy of cancer using a tricistronic retrovirus expressing the two co-stimulation molecules CD70 and CD80²⁰ (Table 2). In addition to the EMCV IRES, several cellular or retroviral IRESs were successful in this approach²¹. *In vivo* gene therapy has also been validated for the treatment of ischemic limb in a mouse model, following intramuscular injection and electrotransfer of a plasmid containing the FGF1 IRES for co-expression of FGF2 and Cyr61²². This study showed that the two angiogenic factors, although expressed at lower doses from the bicistronic vector than from the monocistronic ones, have a synergistical effect in stimulating therapeutic angiogenesis, rendering the bicistronic construct more efficient. More importantly, due to the lower doses of therapeutic molecules, the bicistronic vector induces no side effects on tumoral angiogenesis, in contrast to one of the monocistronic vectors expressing huge amounts of Cyr61. Thus combined gene therapy using IRES-based vectors is also a safer therapeutic approach.

Additional studies have confirmed the successful use of IRES-based vectors for combined treatment of limb ischemia with VEGFA and FGF4 or basic morphogenetic protein7 (BMP7)^{23,24}. Combined gene therapy of cancer was also reported using IRES-based vectors co-expressing IL-12 and CD80, as well as antiangiogenic factors angiostatin and endostatin, or CXCL41 and fibstatin^{25,26} (Table 2). Combination of angiostatin and endostatin in an IRES-based vector was also successful to treat age-related macular degeneration in a mouse model²⁷. In the field of degenerative diseases, mucopolysaccharidosis type IIIA has been addressed in presymptomatic MPS III A mice by intrastriatal administration of an AAV vector co-expressing N-sulfoglycosaminase sulfatase (SGSH) with the sulfatase-modifying factor (SUMF1) (Winner et al, submitted). This study has resulted in a clinical assay²⁸ (see below). Only one report has obtained better data with two separate AAV vectors to deliver FGF14 and a fluorescent protein into *parkinson* neurons, than with an IRES²⁹. This study used the EMCV IRES previously reported to function in neurons³⁰. However it must be underlined that the EMCV IRES is not very active in neurons *in vivo*, by comparison with the FGF2 IRES that is at least ten times more active^{31,32}. In such a case, one can expect that the choice of the FGF2 IRES would provide better data.

Multigene transfer has also been validated for combinations of three genes. A tricistronic IRES-based lentivector expressing three catecholaminergic proteins, Prosalin, was administered by bilateral striatal injection for treatment of Parkinson in rats, resulting in important therapeutic benefits^{33,34} (Table 2). Moreover, a tricistronic 2A-based lentivector administered *in situ* was also efficient in co-expressing Gata4, Meis2 and Tbx5 for postinfarct ventricular functional improvement in rats³⁵.

It is often mentioned that the IRES-driven translation of the downstream cistrons is lower than the cap-dependent first cistron translation. This issue can easily be addressed by intelligent vector design. First, one can take into account the tissue specificity of the IRES by choosing the most adequate IRES rather than using systematically the EMCV IRES. Most bi- and tricistronic vectors use this IRES although it is far to be the best one

Renaud-Gabardos E *et al.* IRES-based vectors for gene therapy

Table 2 Preclinical studies of combined gene therapy using multicistronic vectors

Pathology	Therapeutic genes	Animal model	IRES	Vector type	Ref.
Cancers					
Fibrosarcoma	CD70 + CD80	Mouse	EMCV	Retrovirus	Condorec <i>et al.</i> ^[98] , 1998
Melanoma	Angio-endo fusion	Mouse	None (fusion)	Retrovirus	Scappaticci <i>et al.</i> ^[99] , 2001
Multiple myeloma	IL-12 subunits + CD80	Mouse	EMCV + FMDV	Retrovirus	Wang <i>et al.</i> ^[100] , 2001; Li <i>et al.</i> ^[101] , 2003
Melanoma	CD70 + CD80	Mouse	EMCV, c-myc, FGF2, JH1LV1	Retrovirus	Doulin <i>et al.</i> ^[102] , 2004
Ovarian cancer	Angiostatin + endostatin	Mouse	EMCV	AAV	Isayeva <i>et al.</i> ^[103] , 2005
Head and neck cancer	Angio-endo fusion	Mouse	None (fusion)	Vaccinia virus	Tyousse <i>et al.</i> ^[104] , 2011
Pancreatic cancer	CXCL4L1 + fiblastin	Mouse	FGF1	AAV, Lentivector	Pratt <i>et al.</i> ^[105] , 2013
Cardiovascular diseases					
Limb ischemia	FGF2 + Cyr61	Mouse	FGF1	Plasmid	Rayson <i>et al.</i> ^[106] , 2009
Limb ischemia	VEGFA + BMP7	Rabbit	EMCV	AAV	Zhang <i>et al.</i> ^[107] , 2010
Limb ischemia	VEGFA + FGF4	Mouse	EMCV	AAV	Jaiswal <i>et al.</i> ^[108] , 2013
Heart ischemia	Gata4 + MeGEC + Tbx5	Rat	None (2A element)	Lentivector	Mattison <i>et al.</i> ^[109] , 2014
Neurodegenerative diseases					
Parkinson	TH + AADC + CHD	Rat	EMCV	Lentivector	Alexiou <i>et al.</i> ^[110] , 2002
AMD	Angiostatin + endostatin	Mouse	EMCV	Lentivector	Stewart <i>et al.</i> ^[111] , 2011 Kochu <i>et al.</i> ^[112] , 2009

BMP7: Bone morphogenetic protein 7; Gata4: GATA binding protein 4; MeGEC: Mycocyte-specific enhancer factor 2C; Tbx5: T-box transcription factor 5; TH: Tyrosine hydroxylase; AADC: aromatic L-amino acid decarboxylase; CHD: GTP cyclohydrolase-1; AMD: Age-related macular degeneration.

in many tissues such as muscle or brain^[113]. Second, the IRES efficiency can be improved. It must be noticed that the EMCV IRES activity is very sensitive to the position of the start codon of the gene of interest. This IRES, in contrast to the FGF1 IRES, exhibits no flexibility: the AUG must be positioned just downstream from the IRES. The insertion of a single restriction site between the IRES and the AUG codon is sufficient to inactivate the IRES^[73]. The insertion of a spacer between the first gene and the IRES is also susceptible to enhance the IRES activity by preventing IRES structural alterations by RNA sequences located upstream^[73]. In addition, mutations of the upstream AUG codons in the EMCV IRES improve its efficiency^[74]. Finally, an important parameter is the IRES regulation by microenvironment. In particular, FGF or VEGF IRES activities are more sensitive to hypoxia than the EMCV IRES and may allow a more efficient transgene expression in ischemic diseases.

ALTERNATIVES TO IRESS FOR MULTICISTRONIC VECTORS

IRES-based vectors are not the only approach to co-express several gene products under the control of a single promoter. The first alternative is gene fusion. It has been successfully used to combine endostatin and angiostatin in a treatment of melanoma and of head and neck cancer^[75,96]. A second alternative to IRESSs is the use of alternative splicing-based vectors. Such an approach had been proposed many years ago using retroviral vectors, using the natural alternative splicing features of retrovirus genome^[91,92]. This concept has been developed more recently in the purpose of co-expressing two immunoglobulin chains^[93]. The interest of this system is the ability to adapt the ratio of the two transgenes by mutating the splicing sites. However one limit of this attractive

system is that splicing site efficiency and consequently the ratio of the two proteins of interest, is influenced by the presence of exon splicing enhancers or silencers in the transgene sequences, preventing the design of vectors with a stable transgene ratio applicable to co-expression of any pair of therapeutic proteins.

A third exciting system of co-expression is provided by the 2A peptides. Such peptides, occurring in many viral genomes, are peptide sequences of about 19 amino-acid residues, which can produce a discontinuity in the translated polypeptide when encoded in a longer open reading frame (ORF)^[94]. In contrast to what is currently admitted, 2A peptides do not catalyze a protein cleavage, but they catalyze termination of translation in the absence of a stop codon, followed by reinitiation. They are currently used as a tool to co-express two or more separate proteins from a single ORF^[114]. 2A peptides thus constitute an alternative to IRESSs, but do not work in all systems. By example, in the study in *parkinson* neurons mentioned above, a 2A peptide was used but did not function, resulting in detection of the longer ORF rather than the two expected proteins^[95]. In another report comparing bicistronic constructs expressing Sox9 and EGFP separated by the EMCV IRES or by the FMDV 2A peptide, the authors detected 42% of Sox-EGFP fusion protein, reflecting an inefficient ribosome skipping mechanism^[96]. Formation of such fusion proteins often occurs with proteins bearing N-terminal signal sequences^[97]. In addition, no information is available about the 2A peptides tissue-specificity or behavior in response to stress, in contrast to IRESSs.

CLINICAL APPLICATIONS OF IRES-BASED VECTORS TO GENE THERAPY

All the preclinical studies mentioned above show that

Table 3 Clinical studies of combined gene therapy

Pathology	Therapeutic genes	IRES	Vector type	Outcome	Ref.
Ischemic heart disease	VEGFA + FGF2	EMCV	Plasmid	Moderate benefits	Kukula <i>et al.</i> ⁹⁰ , 2011
Parkinson	TH + AADC + CH1	EMCV	Lentivector	Benefits for 15/15 patients	Palfi <i>et al.</i> ⁹¹ , 2014
Mucopolysaccharidosis type IIIA	SGSH + SUMF1	EMCV	Lentivector	Benefits for 3/4 patients, stabilization for 3/4	Tardieu <i>et al.</i> ⁹² , 2014

TH: Tyrosine hydroxylase; AADC: Aromatic L-amino acid decarboxylase; CH1: GTP cyclohydrolase-1; SC8B: N-sulfoglycosaminase sulfhydrolase; SUMF1: Sulfatase-modifying factor

IRES-based vectors represent an exciting tool to be used for combined gene therapy. Nowadays, very little clinical trials with such vectors have been reported. The first trial to be cited is the tricistronic IL12-expressing retrovirus, which gave significant decrease of tumor sizes on a few patients with melanoma or head and neck cancer^{90,91}.

A bicistronic IRES-based vector co-expressing FGF2 and VEGFA has been assessed in a clinical assay of gene therapy on patients with refractory coronary disease⁹⁰ (Table 3). The protocol corresponded to intramyocardial transfer of a plasmid expressing the bicistronic cassette. This study showed no improvement in myocardial perfusion, but treated patients exhibited improved exercise tolerance and clinical symptoms. Furthermore the bicistronic gene transfer was safe. This moderate benefit, although encouraging, may be due to the use of a plasmid, which does not provide long term expression in contrast to viral vectors, and also to the choice of the EMCV IRES which is not optimal to drive gene expression in hypoxic conditions^{93,94}.

Very recently, two gene therapy clinical trials successfully used multi-cistronic IRES-based viral vectors. On the one hand, a gene therapy I / II phase clinical trial on patients with mucopolysaccharidosis type IIIA, a severe degenerative disease, has displayed neurocognitive benefits⁹². Four children received intracerebral injections of a bicistronic AAV vector expressing the SGSH and SUMF1 genes separated by the EMCV IRES. Neurocognitive evaluations suggest a cognitive benefit on the youngest patient, where as the other ones are stabilized. Importantly, the treatment was safe and well tolerated after 1 year in all the patients, validating the surgical approach for direct AAV delivery in the brain parenchyma. On the other hand, a phase I / II assay was performed on 15 patients with Parkinson's disease using Prosavin (see above), a tricistronic lentivector with EMCV IRESs administered by intrastratial delivery⁹¹. A significant improvement of motor scores was recorded in all patients at 6 mo. This is the first-in-man use of a lentiviral-based gene therapy vector for a neurodegenerative disease. These studies validate the clinical use of IRES-based viral vectors.

CONCLUSION

Many reports have shown that combined gene therapy is an attractive approach in animal models. This observation has justified extensive research on optimization of gene transfer vectors able to co-express several proteins. In this context, IRES-based vectors have now been validated in

pre-clinical as well as in clinical studies by showing their safety and ability to generate therapeutic benefits.

In addition, the data available on IRES tissue-specificity and activation in response to stress provide promising perspectives of vector improvement, which may result in better efficiency of gene therapy.

REFERENCES

1. **Campochiaro PA.** Gene transfer for ocular neovascularization and macular edema. *Gene Ther* 2012; **19**: 121-126 [PMID: 22071973 DOI: 10.1038/gt.2011.164]
2. **Couderec B,** Zitvogel L, Doute-Echinard V, Djennane L, Tahari H, Favre C, Lotze MT, Robbins PD. Enhancement of antitumor immunity by expression of CD70 (CD27 ligand) or CD134 (CD40 ligand) costimulatory molecules in tumor cells. *Cancer Gene Ther* 1998; **5**: 163-175 [PMID: 9622100]
3. **Ponnazhagan S,** Mahendra G, Kumar S, Shaw DR, Stockard CR, Grizzle WE, Meleth S. Adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic cancer gene therapy: long-term efficacy of a vector encoding angiostatin and endostatin over vectors encoding a single factor. *Cancer Res* 2004; **64**: 1781-1787 [PMID: 14996740]
4. **Scappaticci FA,** Smith R, Pathak A, Schloss D, Lum B, Cao Y, Johnson F, Engleman EG, Nolan GP. Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity in vitro and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. *Mol Ther* 2001; **3**: 186-196 [PMID: 11237675]
5. **Chae JK,** Kim I, Lim ST, Chung MJ, Kim WH, Kim HG, Ko JK, Koh GY. Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 2573-2578 [PMID: 11116053]
6. **Cao R,** Bråkenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post M, Wahlberg E, Leebouh P, Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 2003; **9**: 604-613 [PMID: 12669032]
7. **Malecki J,** Wesche J, Skjerpen CS, Wiedlocha A, Olsson S. Translocation of FGF-1 and FGF-2 across vesicular membranes occurs during G1-phase by a common mechanism. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 801-814 [PMID: 14657241]
8. **Fussenegger M,** Moser S, Bailey JE. pQuattro vectors allow one-step multigene metabolic engineering and auto-selection of quattrocistronic artificial mammalian operons. *Cytotechnology* 1998; **28**: 229-235 [PMID: 19003423]
9. **Allera-Moreau C,** Delluc-Clavières A, Castano C, Van den Berghe L, Golzio M, Moreau M, Teissie J, Arnal JF, Prats AC. Long term expression of bicistronic vector driven by the FGF-1 IRES in mouse muscle. *BMC Biotechnol* 2007; **7**: 74 [PMID: 17963525]
10. **Rayssac A,** Neveu C, Pucelle M, Van den Berghe L, Prado-Lorenzo L, Arnal JF, Chaurou X, Prats AC. IRES-based vector coexpressing FGF2 and Cyr61 provides synergistic and safe therapeutics of lower limb ischemia. *Mol Ther* 2009; **17**: 2010-2019 [PMID: 19738600 DOI: 10.1038/mt.2009.211]

- 11 Kozak M. Migration of 40S ribosomal subunits on messenger RNA when initiation is perturbed by lowering magnesium or adding drugs. *J Biol Chem* 1979; **254**: 4731-4738 [PMID: 439212]
- 12 Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 1989; **108**: 229-241 [PMID: 2645293]
- 13 Jang SK, Kräusslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmberg AC, Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J Virol* 1988; **62**: 2636-2643 [PMID: 2839600]
- 14 Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 1988; **334**: 320-325 [PMID: 2839775]
- 15 Macejak DG, Sarnow P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 1991; **353**: 93-94 [PMID: 1652694]
- 16 Coldwell MJ, Mitchell SA, Stoneley M, MacFarlane M, Willis AE. Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene* 2000; **19**: 899-905 [PMID: 10702798]
- 17 Holcik M, Lefebvre C, Yeh C, Chow T, Korneluk RG. A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 190-192 [PMID: 10599007]
- 18 Nanbru C, Lafon I, Audigier S, Gensac MC, Vagner S, Huez G, Prats AC. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem* 1997; **272**: 32061-32066 [PMID: 9405401]
- 19 Stoneley M, Paulin PE, Le Quesne JP, Chappell SA, Willis AE. C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* 1998; **16**: 423-428 [PMID: 9467968]
- 20 Vagner S, Gensac MC, Mare A, Bayard F, Amalric F, Prats H, Prats AC. Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 35-44 [PMID: 7799942]
- 21 Berlioz C, Durif JL. An internal ribosomal entry mechanism promotes translation of murine leukemia virus gag polyprotein precursors. *J Virol* 1995; **69**: 2214-2222 [PMID: 7884868]
- 22 Vagner S, Waymouth A, Marenda M, Gensac MC, Amalric F, Prats AC. Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 20376-20383 [PMID: 7657611]
- 23 Jackson RJ. mRNA translation. Initiation without an end. *Nature* 1991; **353**: 14-15 [PMID: 1958253]
- 24 Audigier S, Guiraudand J, Prado-Laurencio L, Conte C, Gonzalez-Herrera IG, Cohen-Solal C, Récausens M, Prats AC. Potent activation of FGF-2 IRES-dependent mechanism of translation during brain development. *RNA* 2008; **14**: 1852-1864 [PMID: 18676616 DOI: 10.1261/rna.790608]
- 25 Bernstein J, Sella O, Le SY, Elroy-Stein O. PDGF2/c-sis mRNA leader contains a differentiation-linked internal ribosomal entry site (D-IRES). *J Biol Chem* 1997; **272**: 9356-9362 [PMID: 9083072]
- 26 Conte C, Almouy N, Delluc-Clavières A, Khoury ME, Azar R, Pujol F, Martineau Y, Pironnet S, Prats AC. Fibroblast growth factor 1 induced during myogenesis by a transcription-translation coupling mechanism. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 5267-5278 [PMID: 19561198 DOI: 10.1093/nar/gkp550]
- 27 Gonzalez-Herrera IG, Prado-Laurencio L, Pleur F, Comé C, Morn A, Cabon F, Prats H, Vagner S, Bayard F, Audigier S, Prats AC. Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEB J* 2006; **20**: 476-478 [PMID: 16423876]
- 28 Cornelis S, Bruyninckx Y, Denecker G, Van Huffel S, Tinton S, Beyaert R. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 2000; **5**: 597-605 [PMID: 10802066]
- 29 Pironnet S, Pradayrol L, Sonenberg N. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 2000; **5**: 607-616 [PMID: 10802067]
- 30 Marcel V, Ghayad SE, Belin S, Therizols G, Morel AP, Solano-Gonzalez E, Vendrell JA, Hacoit S, Mertani HC, Altmann MA, Bazzdon JC, Jordan L, Thompson A, Tafer Y, Comg R, Bouvet P, Sourin JC, Calvez F, Prats AC, Puisieux A, Diaz JJ. p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell* 2013; **24**: 318-330 [PMID: 24029231 DOI: 10.1016/j.ccr.2013.08.013]
- 31 Bórnes S, Prado-Laurencio L, Bastide A, Zanibellato C, Iacovini JS, Lacazette E, Prats AC, Touriol C, Prats H. Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ Res* 2007; **100**: 305-308 [PMID: 17255526]
- 32 Braunstein S, Karpisheva K, Pola C, Goldberg J, Hochman T, Yee H, Cangiarrella J, Arju R, Formenti SC, Schneider RJ. A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol Cell* 2007; **28**: 501-512 [PMID: 17996713]
- 33 Conte C, Riant E, Toutain C, Pujol F, Arnaud JF, Lefani E, Prats AC. FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1alpha. *PLoS One* 2008; **3**: e3078 [PMID: 18728783 DOI: 10.1371/journal.pone.0003078]
- 34 Damiano F, Alemanno S, Groni GV, Siculella L. Translational control of the steroid-regulatory transcription factor SREBP-1 mRNA in response to serum starvation or ER stress is mediated by an internal ribosome entry site. *Biochem J* 2010; **429**: 603-612 [PMID: 20513236 DOI: 10.1042/BJ20091827]
- 35 Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 318-327 [PMID: 15803138]
- 36 Morfouisse F, Kuchnio A, Frainay C, Gomez-Bouchet A, Delisle MB, Marzi S, Helfer AC, Hantelys F, Pujol F, Guillermet-Guibert J, Bousquet C, Dewerchin M, Pironnet S, Prats AC, Carmeliet P, Carney-Susini B. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1α-independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep* 2014; **6**: 155-167 [PMID: 24388748 DOI: 10.1016/j.celrep.2013.12.011]
- 37 Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CU. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 1998; **12**: 67-83 [PMID: 9420332]
- 38 Filipenko EV, Gmyl AP, Maslova SV, Svitkin YV, Sinyakov AN, Agol VI. Prokaryotic-like cis elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA. *Cell* 1992; **68**: 119-131 [PMID: 1310072]
- 39 Moss B, Elroy-Stein O, Mizukami T, Alexander WA, Foerster TR. Product review. New mammalian expression vectors. *Nature* 1990; **348**: 91-92 [PMID: 2254068]
- 40 Allera-Moreau C, Chomarat P, Audinot V, Cogé F, Gillard M, Martineau Y, Boutin JA, Prats AC. The use of IRES-based bicistronic vectors allows the stable expression of recombinant G-protein coupled receptors such as NPY5 and histamine 4. *Biochimie* 2006; **88**: 737-746 [PMID: 16808994]
- 41 Morgan RA, Couture L, Elroy-Stein O, Ragheb J, Moss B, Anderson WF. Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 1293-1299 [PMID: 1313966]
- 42 Zitzvogel L, Tahara H, Cai Q, Storkus WJ, Müller G, Wolf SF, Cateley M, Robbins PD, Litzke MT. Construction and characterization of retroviral vectors expressing biologically active human interleukin-12. *Hum Gene Ther* 1994; **5**: 1493-1506 [PMID: 7711142]
- 43 Arnaud E, Touriol C, Bouteonnet C, Gensac MC, Vagner S, Prats H, Prats AC. A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival

- factor. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 505-514 [PMID: 9858574]
44. Créancier L, Morello D, Mercier P, Prats AC. Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity *ex vivo* and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J Cell Biol* 2000; **150**: 275-281 [PMID: 10893274]
 45. Créancier L, Mercier P, Prats AC, Morello D. c-myc internal ribosome entry site activity is developmentally controlled and subjected to a strong translational repression in adult transgenic mice. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 1833-1840 [PMID: 11238920]
 46. Bosch MK, Nerbonne JM, Ornitz DM. Dual transgene expression in murine cerebellar Purkinje neurons by viral transduction *in vivo*. *PLoS One* 2014; **9**: e104062 [PMID: 25093726 DOI: 10.1371/journal.pone.0104062]
 47. Martineau Y, Le Bec C, Monbrun L, Allo V, Chir IM, Danos O, Moine H, Prats H, Prats AC. Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 3 alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 7622-7635 [PMID: 15314170]
 48. Delluc-Clavières A, Le Bec C, Van den Berghe L, Conte C, Allo V, Danos O, Prats AC. Efficient gene transfer in skeletal muscle with AAV-derived bicistronic vector using the FGF-1 IRES. *Gene Ther* 2008; **15**: 1090-1098 [PMID: 18369321 DOI: 10.1038/gt.2008.49]
 49. Spriggs KA, Bushell M, Mitchell SA, Willis AE. Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ* 2005; **12**: 585-591 [PMID: 15900315]
 50. Thakor N, Holcik M. IRES-mediated translation of cellular messenger RNA operates in eIF2α independent manner during stress. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 541-552 [PMID: 21917851 DOI: 10.1093/nar/gkr701]
 51. Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ. Hypoxia-inducible factor-1α mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 1792-1801 [PMID: 12006670]
 52. Schepens B, Tinson SA, Bruynoghe Y, Beyaert R, Cornelis S. The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1α IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 6894-6894 [PMID: 16396835]
 53. Rumanelli MG, Diari E, Lievens PM. New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein. *Int J Mol Sci* 2013; **14**: 22906-22932 [PMID: 24264039 DOI: 10.3390/ijms141122906]
 54. Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O, Levi BZ. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 1998; **17**: 227-236 [PMID: 9674707]
 55. Huez I, Créancier L, Audigier S, Gensac MC, Prats AC, Prats H. Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 6178-6190 [PMID: 9774635]
 56. Stein I, Bin A, Eini P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E. Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3112-3119 [PMID: 9584152]
 57. Morfoisse F, Renaud E, Hantelys F, Prats AC, Garmy-Susini B. Lymphangiogenic gene expression adaptation in tumor hypoxic environment. *Mol Sci (Paris)* 2014; **30**: 506-508 [PMID: 24909534 DOI: 10.1051/medsci/2014005010]
 58. Kupatt C, Hinkel R, Pföner A, El-Aouni C, Wuchner A, Fritz A, Globisch F, Thormann M, Horstkotte J, Leberer C, Thein E, Banfi A, Bookstegers P. Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-β via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *J Am Coll Cardiol* 2010; **56**: 414-422 [PMID: 20650363 DOI: 10.1016/j.jacc.2010.03.050]
 59. Lee JS, Kim JM, Kim KL, Jang HS, Shin IS, Jeon ES, Suh W, Byun J, Kim DK. Combined administration of naked DNA vectors encoding VEGF and bFGF enhances tissue perfusion and arteriogenesis in ischemic hindlimb. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **360**: 752-758 [PMID: 17624309]
 60. Ohlfest JR, Demarest ZL, Motooka Y, Vengco J, Oh S, Chen E, Scappaticci FA, Sapijs RJ, Ekker SC, Low WC, Freese AB, Largaespada DA. Combinatorial antiangiogenic gene therapy by nonviral gene transfer using the sleeping beauty transposon causes tumor regression and improves survival in mice bearing intracranial human glioblastoma. *Mol Ther* 2005; **12**: 778-788 [PMID: 16150649]
 61. Zhang X, Xu J, Lawler J, Terwilliger E, Parangi S. Adeno-associated virus-mediated antiangiogenic gene therapy with thrombospondin-1 type 1 repeats and endostatin. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 3968-3976 [PMID: 17606731]
 62. Abmayr S, Gregorevic P, Allen JM, Chamberlain JS. Phenotypic improvement of dystrophic muscles by rAAV/microdystrophin vectors is augmented by Igf1 codelivery. *Mol Ther* 2005; **12**: 441-450 [PMID: 16099410]
 63. Douin V, Bornes S, Créancier L, Rochais P, Favre G, Prats AC, Coudere B. Use and comparison of different internal ribosomal entry sites (IRES) in tricistronic retroviral vectors. *BMC Biotechnol* 2004; **4**: 16 [PMID: 15279677]
 64. Jazwa A, Tomczyk M, Taha HM, Hytonen E, Stoszko M, Zentilin L, Giacca M, Yla-Herttuala S, Emanueli C, Jozkowicz A, Dulak J. Arteriogenic therapy based on simultaneous delivery of VEGF-A and FGF4 genes improves the recovery from acute limb ischemia. *Vasc Cell* 2013; **5**: 13 [PMID: 23816205 DOI: 10.1186/2045-8248-5-13]
 65. Zhang C, Wang KZ, Qiang H, Tang YL, Li Q, Li M, Dang XQ. Angiogenesis and bone regeneration via co-expression of the hVEGF and hBMP genes from an adeno-associated viral vector *in vitro* and *in vivo*. *Acta Pharmacol Sin* 2010; **31**: 821-830 [PMID: 20581855 DOI: 10.1038/aps.2010.67]
 66. Isayeva T, Ren C, Ponnazhagan S. Recombinant adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic prevention in a mouse model of intraperitoneal ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003; **11**: 1342-1347 [PMID: 15709207]
 67. Li ZH, Wen XY, Mandelbaum S, Falcioni N, Hawley TS, Hawley BC, Stewart AK. Improved therapeutic outcome following combination immunogene vaccination therapy in murine myeloma. *Leuk Lymphoma* 2003; **44**: 1775-1784 [PMID: 14692533]
 68. Prats AC, Van den Berghe L, Raymaekers A, Aitani N, Morhaise F, Pujol F, Legonider S, Bikdalvi A, Prats H, Pyronnet S, Garmy-Susini B. CXCL4L1-fibronectin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Micromet Res* 2013; **89**: 25-33 [PMID: 23747987 DOI: 10.1016/j.mvr.2013.05.005]
 69. Wen XY, Mandelbaum S, Li ZH, Fitt M, Graham FL, Hawley TS, Hawley RG, Stewart AK. Tricistronic viral vectors co-expressing interleukin-12 (IL-12) and CD80 (B7-1) for the immunotherapy of cancer: preclinical studies in myeloma. *Cancer Gene Ther* 2001; **8**: 361-370 [PMID: 11477456]
 70. Kachi S, Binley K, Yokoi K, Umeda N, Akiyama H, Muramatsu D, Iqbal S, Kan O, Naylor S, Campochiaro PA. Equine infectious anemia viral vector-mediated codelivery of endostatin and angiostatin driven by retinal pigmented epithelium-specific VMD2 promoter inhibits chorioidal neovascularization. *Hum Gene Ther* 2009; **20**: 31-39 [PMID: 20377369 DOI: 10.1089/hum.2008.046]
 71. Tardieu M, Zerah M, Hussenot B, de Bournonville S, Doiva K, Adamsbaum C, Vincent F, Hocquemiller M, Broissand C, Furlan V, Ballabio A, Fraldi A, Crystal RG, Baugnon T, Roujeau T, Heard JM, Danos O. Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGLT and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum Gene Ther* 2014; **25**: 506-516 [PMID: 24524415]

Renaud-Gabardos E et al. IRES-based vectors for gene therapy

- DOI: 10.1089/hum.2013.238]
72. Derrington EA, López-Lastra M, Daris JL. Dicitronic MLV-retroviral vectors transduce neural precursors in vivo and co-express two genes in their differentiated neuronal progeny. *Retirology* 2005; **2**: 60 [PMID: 16194277]
 73. Azzouz M, Martin-Rendon E, Barker RD, Mitrophanous KA, Carter EE, Rohlf JB, Kingman SM, Kingman AJ, Mazarakis ND. Multicistronic lentiviral vector-mediated striatal gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and GTP cyclohydrolase I induces sustained transgene expression, dopamine production, and functional improvement in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2002; **22**: 10302-10312 [PMID: 12451130]
 74. Stewart HJ, Fong-Wong L, Strickland I, Chipchase D, Kelleher M, Stevenson L, Thorpe V, McCarthy J, Ralph GS, Mitrophanous KA, Radcliffe PA. A stable producer cell line for the manufacture of a lentiviral vector for gene therapy of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 2011; **22**: 357-369 [PMID: 21070114 DOI: 10.1089/hum.2010.142]
 75. Mathison M, Singh VP, Gerschlager RP, Ramirez MO, Cooney A, Kaminsky SM, Chiacchiolo MJ, Nasser A, Yang J, Crystal RG, Rensvold TK. "Triplet" polycistronic vectors encoding Gab1, Me2c, and Tbx5 enhances postinfarct ventricular functional improvement compared with singlet vectors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014; **148**: 1656-1664.e2 [PMID: 24755332 DOI: 10.1016/j.jtcvs.2014.03.033]
 76. Martin P, Allaghi O, Poggi MC, Bouloukos KE, Pogorelec P. Development of a new bicistronic retroviral vector with strong IRES activity. *BMC Biotechnol* 2006; **6**: 4 [PMID: 16409632]
 77. Jeong YH, Park CH, Jang GH, Jeong YI, Hwang IS, Jeong YW, Kim YK, Shin T, Kim NH, Hyun SH, Jeong EB, Hwang WS. Production of multiple transgenic Yucatan miniature pigs expressing human complement regulatory factors, human CD55, CD59, and H-transferrin genes. *PLoS One* 2013; **8**: e65241 [PMID: 23704897 DOI: 10.1371/journal.pone.0065241]
 78. Koh EY, Ho SC, Mariati Z, Bi X, Bardor M, Yang Y. An internal ribosome entry site (IRES) mutant library for tuning expression level of multiple genes in mammalian cells. *PLoS One* 2013; **8**: e82100 [PMID: 24349195 DOI: 10.1371/journal.pone.0082100]
 79. Scappaticci FA, Contreras A, Smith R, Bonhoure L, Lum B, Cao Y, Engleman EG, Nolan GP. Statin-AE: a novel angiostatin-endostatin fusion protein with enhanced antiangiogenic and antitumor activity. *Angiogenesis* 2001; **4**: 263-268 [PMID: 12197471]
 80. Tysome JR, Wang P, Alusi C, Briat A, Gangarwan R, Wang J, Bhakta V, Fodor J, Lemoine NR, Wang Y. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin-angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl1520 (CINXX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther* 2011; **22**: 1101-1108 [PMID: 21361787 DOI: 10.1089/hum.2010.172]
 81. Cepko CL, Roberts BE, Mulligan RC. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* 1984; **37**: 1053-1062 [PMID: 6351674]
 82. Korman AJ, Frazer JD, Strominger JL, Mulligan RC. Expression of human class II major histocompatibility complex antigens using retrovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2150-2154 [PMID: 3031667]
 83. Fallot S, Ben Naya R, Hieblot C, Mondon P, Lacazette E, Bouayadi K, Kharrat A, Touriol C, Probs H. Alternative-splicing-based bicistronic vectors for ratio-controlled protein expression and application to recombinant antibody production. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: e134 [PMID: 19729510 DOI: 10.1093/nar/gkp716]
 84. Doronina VA, Wu C, de Felipe P, Sachs MS, Ryan MD, Brown JD. Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 4227-4239 [PMID: 18458056 DOI: 10.1128/MCB.00421-08]
 85. de Felipe P, Luke GA, Hughes LE, Gani D, Halpin C, Ryan MD. E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polypeptide. *Trends Biotechnol* 2006; **24**: 68-75 [PMID: 16380176]
 86. Chan HY, V S, Xing X, Kraus P, Yap SP, Ng P, Lim SL, Lufkin T. Comparison of IRES and F2A-based locus-specific multicistronic expression in stable mouse lines. *PLoS One* 2011; **6**: e28885 [PMID: 22216134 DOI: 10.1371/journal.pone.0028885]
 87. de Felipe P, Luke GA, Brown JD, Ryan MD. Inhibition of 2A-mediated 'cleavage' of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences. *Biochem J* 2010; **5**: 213-223 [PMID: 19946875 DOI: 10.1002/biot.200900134]
 88. Lotze MT, Zitvogel L, Campbell R, Robbins PD, Elder E, Halaszczak C, Martin D, Whiteside TL, Storkus WJ, Tahara H. Cytokine gene therapy of cancer using interleukin-12: murine and clinical trials. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **795**: 440-454 [PMID: 8958077]
 89. Tahara H, Zitvogel L, Storkus WJ, Zeh HJ, McKinney TC, Schreiber RD, Gubler U, Robbins PD, Lotze MT. Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *J Immunol* 1995; **154**: 6466-6474 [PMID: 7759882]
 90. Kukula K, Chojnowski M, Dąbrowski M, Witkowski A, Chmielek Z, Skowarek M, Kadziela J, Teresińska A, Malecki M, Janik P, Lewandowski Z, Kłopotowski M, Wruck J, Ruzyllo W. Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD). *Am Heart J* 2011; **161**: 581-589 [PMID: 21392615 DOI: 10.1016/j.ahj.2010.11.023]
 91. Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, Lepetit H, Laviisse S, Buttery PC, Watts C, Miskin J, Kelleher M, Deeley S, Iwamoto H, Leflaucheur JP, Thiriez C, Fenelon G, Lucas C, Brugieres P, Gabriel I, Abhay K, Drouot X, Tani N, Kas A, Ghaleb B, Le Corvoisier P, Dolphin P, Broom DP, Mason S, Gorman NV, Mazarakis ND, Radcliffe PA, Harrop R, Kingman SM, Rascol O, Naylor S, Barker RA, Hantraye P, Remy P, Cesaro P, Mitrophanous KA. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 2014; **383**: 1138-1146 [PMID: 24412048 DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61909-X]

P-Reviewer: Mioduszewski P, Samulski RJ S-Editor: Ji FF
L-Editor: A E-Editor: Wu HL



**APELIN IS INVOLVED IN THE MAINTENANCE OF
LYMPHATIC BARRIER INTEGRITY IN ISCHEMIC HEART DISEASE**

Florence Tatin^{1*}, Edith Renaud-Gabardos¹, Fransky Hantelys¹, Anne-Claire Godet¹, Florent Morfoisse², Denis Calise³, Philippe Valet¹, Bernard Masri¹, Anne-Catherine Prats¹ and Barbara Garmy-Susini¹

¹ I2MC INSERM UMR 1048, Toulouse Cedex, France.

² Laboratory of Tumor and Developmental Biology, GIGA-Cancer, Liège, Belgium.

³ UMS 006, Inserm, UPS, F-31432 Toulouse, France.

Running title: Apelin controls lymphatic integrity in disease

En révision dans Circulation Research

Correspondence to florence.tatin@inserm.fr, Phone: 33 (0) 5 61 32 38 18, Fax: 33 (0)5 61 32 56 22

Word count: 7195

Subject codes:

Abstract

Rationale: Lymphatic endothelial wall serves as barrier to control fluid homeostasis and immune cell trafficking to maintain tissue homeostasis. Long-term alteration of lymphatic vasculature promotes edema and fibrosis, which is an aggravating factor to the onset of cardiovascular diseases such as myocardial infarction (MI). Apelin is a bioactive peptide playing a central role in angiogenesis and cardiac contractility. Despite an established role of apelin in lymphangiogenesis, little is known about its function on the cardiac lymphatic endothelium.

Objective: We explored whether apelin could improve the lymphatic system integrity during ischemic heart injury.

Methods and Results: Using apelin loss of function mice model, we identify morphological and functional defects on lymphatic vasculature. After acute MI, apelin is rapidly overexpressed in the ischemic heart in wild-type mice. Then, the chronic phase of myocardial infarction is characterized by the growth of newly formed hyperplastic and abnormal lymphatic vessels, which expressed apelin receptor APJ. Importantly, the overexpression of apelin in ischemic heart is sufficient to restore a normal lymphatic morphology post-MI with a reduction of hyperplasia and vessel diameter. *In vitro* analysis of lymphatic endothelial cells (LEC) revealed that hypoxia altered cell-cell junction organization leading to a defect in VE-cadherin recruitment and cortical actin cytoskeleton assembly. Finally, we found that apelin prevents the hypoxia-induced hyperpermeability of LEC monolayer.

Conclusion: Apelin is a critical mediator of barrier integrity on the lymphatic endothelium in myocardial infarction. Thus, apelin may represent a novel candidate to prevent adverse effect of ischemic injuries on pathological lymphatic remodeling.

Key words: lymphatic vessels, apelin, myocardial infarction,

Non-standard Abbreviations and Acronyms

MI: Myocardial infarction

LV: Left ventricular

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

BEC: Blood endothelial cells

LEC: Lymphatic endothelial cells

LV: Left ventricular

MI: Myocardial infarction

INTRODUCTION

Preserving the vascular lymphatic barrier is essential to maintain tissue fluid homeostasis and immune cell trafficking to perform the immune surveillance. The integrity of the lymphatic vasculature relies on the adhesive and mechanical properties of specialized junctions on lymphatic capillaries that allow unidirectional entry of fluids, solutes and immune cells drained into larger collecting vessels. A defect in the lymphatic drainage is associated with severe edema, which is aggravating factor in a large spectrum of pathologies such as heart ischemia, lymphedema, and chronic inflammatory diseases.

In particular, recent literature demonstrated that lymphatic drainage plays a major role in myocardial infarction (MI).¹ MI is caused by the left coronary obstruction that leads to an orchestrated series of events, initiated by immune cell infiltration (inflammatory phase), and followed by edema and an adverse left ventricular (LV) remodeling, chronic inflammation, fibrosis, and angiogenesis. Ischemic heart exhibits dysfunctional lymphatic network that participates into the development of chronic myocardial edema and aggravated cardiac dysfunction.^{1, 2} Therefore, improving the integrity of the lymphatic vascular wall remains an emerging challenge in cardiovascular biology. VEGF-A was the first vascular growth factor identified to improve angiogenesis post-MI.³ However, phase II clinical trials showed that VEGF-A is not efficient to improve the contractile function of ischemic heart.⁴ To date, our understanding about the molecular mechanisms leading to a restricted activation of lymphatic vessels in diseases has been mainly associated to the VEGF-C/VEGFR-3 signaling. VEGF-C, the major lymphangiogenic growth factor that binds its receptor VEGFR-3, restores a functional lymphatic vasculature in model of lymphedema, chronic inflammatory bowel diseases and lung allograft.⁵⁻⁷ Recently, VEGF-C has been shown to improve cardiac function in mice model of myocardial infarction^{1, 2} despite the maintenance of an impaired lymphatic function.¹ Altogether, these observations demonstrated that identifying novel actors in cardiac vascular repair, in particular the maintenance of vascular integrity remains a crucial challenge to restore heart function. In that context, the bioactive peptide apelin is a critical player of both lymphangiogenesis and cardiac function.^{8,9,10} Apelin promotes lymphatic development in zebrafish¹¹ and, despite a normal embryonic lymphatic vasculature in apelin-deficient mice¹², a link between apelin and lymphatic endothelium has been clearly established in pathological models. Apelin promotes tumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis.¹³ In diet-induced obesity mice models, the lack of apelin leads to hyperplastic and abnormal leakiness of lymphatic vasculature suggesting a role in lymphatic wall integrity.¹⁴ Also, apelin improves cardiac contractility and blood pressure in failing hearts.¹⁵⁻¹⁹ Its receptor APJ, a G protein-coupled receptor, is a potent regulator of cardiac angiogenesis and responds to stretch signals to induce heart hypertrophy.¹⁵ Also, apelin expression is strongly induced by hypoxic stress.²⁰

In the present study, we focused onto the role of apelin signaling on cardiac lymphatic wall integrity. We showed that apelin-deficient mice exhibit abnormal dilated and leaky lymphatic vasculature leading to a proinflammatory status. We found an adverse remodeling of the

lymphatic network during cardiac ischemia associated with an expression of apelin receptor APJ on activated lymphatic endothelium. Interestingly, the overexpression of apelin in ischemic heart prevented abnormal remodeling of lymphatic vasculature by reducing hyperplasia and vessel diameter. Mechanistically, we found that hypoxia impair lymphatic monolayer integrity by inducing loss intercellular junctions and higher permeability. This effect was abolished by apelin. Thus, our data highlighted a protective role of apelin/APJ signaling on lymphatic endothelium in myocardial ischemia and a novel mechanism to control the integrity of the lymphatic endothelium.

METHODS

A detailed methods is available in the Online Data Supplement.

Mice

Animal experiments were conducted in accordance with recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimentation. All animal experiments were performed according to the INSERM IACUC guidelines for laboratory animals' husbandry and have been approved by the local branch Inserm Ranguieu-Purpan of the Midi-Pyrénées ethics committee. Apelin-KO mice were obtained from Dr Philippe Valet (I2MC, Toulouse, France). Wild-type (WT) mice C57BL/6 background (provided by Janvier) were used as controls. All mice were aged between 8 to 10 weeks old.

Flow cytometry

Heart cut into small pieces were dissociated with liberase TM enzyme (Roche) for 10 min at 37°C. Supernatants were filtered through a 100µm cell strainer into a 50ml tube on ice. After lysis of erythrocytes (RBC lysis buffer, ebiosciences), cells were filtered through a 40µm cell strainer. Cells were incubated with Fc Blocking antibody CD16/CD32 for 30 min, and then stained for the following antibodies on ice for 30 min: APC-CD31 and BB515-CD45 (BD-pharmingen), LYVE-1-PE (RD systems), CD19-PercP-vio700, CD3-PE-vio770, CD11b-PE-vio770 from Miltenyi Biotec, PercP/Cy5.5 CD206 (Biolegend). Dead cells were excluded from analysis using live dead violet staining (Invitrogen). Flow cytometry was performed using a BD Fortessa cytometer and FACSDiva software analysis.

Cardiac LEC isolation

9-10 hearts from WT mice were pooled to isolate cardiac LEC. We performed the same experiment for sham mice and post-MI mice. LECs from hearts were dissociated as described previously using LYVE-1-PE, CD45-BB515 and CD31-APC antibody. LECs (LYVE-1+ CD31+ CD45-) and BECs (LYVE-1- CD31+ CD45-) were separated using a BD influx cell sorter.

RNA isolation and Real-Time PCR analysis

Total RNA from *in vivo* isolated cells and *in vitro* LEC were extracted with RNAqueous-Micro Kit (Ambion). cDNA synthesis was carried out using superscript Vilo enzyme (Invitrogen). For primary LEC, we used the High capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems). RNA isolation from ischemic heart was carried out with Trizol reagent (Ambion). Real-time RT-PCR reactions were carried out on ABI stepone (Applied Biosystems).

Immunohistochemistry and Image analysis

Cardiac lymphangiogenesis was determined from paraformaldehyde-fixed paraffin or cryostat sections. Sections were numbered from the apex to the atrioventricular region in order to have a consistent and reproducible analysis: each slide was separated by 60µm with a gap of 250µm every 10 slides. Analysis on paraffin sections was done with LYVE-1 antibody followed with secondary antibody (Impress reagent kit, Vector labs) and DAB revelation (Vector labs). Immunofluorescence on cryosections were performed using the following antibody: anti-mouse LYVE-1 (Rockland), Neuropilin-2 and VEGFR3 (RD systems), CD31 (BD), collagen I and IV (Serotec), Podoplanin (Developmental studies hybridoma bank).

Apelin and APJ antibodies have been already described.²¹ Images were acquired using an LSM780 laser scanning confocal microscope (Zeiss) or Nanozoomer (Hamamatsu) for slide sections imaging. Image analysis (vessels area, length or number of branch points) was done with Image J software.

Lymphography

Mice were anesthetized with a subcutaneous injection of ketamine (15 mg/kg), xylazine (1 mg/kg). FITC-dextran (Sigma) was injected into the footpad of control or APL-KO mice. After 5 min, the skin was analyzed under the microscope (Leica Dmi8).

Whole-mount imaging

Heart were fixed with paraformaldehyde 4% for 6h then washed with PBS during 2 days. Permeabilization was performed in 0.3% Triton-PBS solution for 2 days before adding LYVE-1 antibody. After several wash, heart were incubated with secondary antibody alexa-fluor 488 (Jackson Immunoresearch) for 1 day. Post-staining fixation in 2% PFA was performed. Whole heart imaging was done under Macrofluor Leica microscopy. Hearts were sectioned in 2 parts (ventral versus dorsal part) to image lymphatic vessels and collagen fibers under the Bi-photon 7MP (Zeiss).

Cell culture

HDLECs were cultured in endothelial growth medium MV2 (EGM-MV2)(Promocell) according to manufacturer instructions. For hypoxia experiments, cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere under hypoxic (1% O₂) using a hypoxia chamber (Biospherix) or

normoxic (21% O₂) conditions at indicated times in Figure legends. Cells were cultured at 80% sub-confluence and reach full-confluence under hypoxic conditions. Proliferation, and branching assays were performed as previously described (⁶¹). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and antibodies staining were performed for VE-Cadherin (Santa cruz), Claudin-5 (life technology). Actin cytoskeleton was visualized by phalloidin-488 (Cytoskeleton). Quantification of fluorescence intensity was performed with Image J software. All images were taken with the same gain and laser intensity.

Permeability assay: LECs were cultured under confluence during 2 days on cell culture inserts (0.4µM, Millicell) and then incubated 24h under hypoxic or normoxic conditions as indicated in Figure legends. FITC-dextran 70KD (1mg/ml) were added and fluorescence intensity were measured 2h after in lower chamber by Tecan Infinite 500.

Statistical Analysis

Experiments unless otherwise noted are representative of at least three independent experiments. Results are reported as mean± SD or mean±SEM as indicated in Figure legends. Statistical analyses were performed using unpaired two-tailed Student's t-test.

RESULTS

Functional defects of lymphatic vasculature in apelin-KO mice

To determine whether apelin regulates lymphatic vessel development, we initially analyzed the lymphatic vasculature by immunohistochemical analysis in different vascular beds of apelin-deficient mice. An intricate network of lymphatic capillaries and collecting vessels was seen on ear skin in wild-type versus apelin-deficient mice. However, a surprisingly enlargement of lymphatic vasculature was observed in apelin-KO mice (Figure 1A). Our finding was also confirmed in back dermal skin tissue and in heart (Figure 1A) indicating that the dilation of lymphatic vessels is an overall phenotype in apelin-KO mice and not organ-specific. The lack of apelin had no effect on the lymphatic vessel branching and density compared to control (Figure 1B and 1C) whereas we noted an increase in diameter of lymphatic vessels (Figure 1D and 1E). The presence of highly dilated lymphatic vessels in apelin-deficient mice suggests a disrupted lymphatic drainage leading to overloaded vessels. To evaluate whether changing in lymphatic morphology correlates with compromised lymphatic drainage, we performed skin lymphography by injecting FITC-dextran in mice footpad. We observed a strong leakage of the lymphatic system associated with a dermal backflow of the dye (Figure 1E). Taken together, these data revealed an undescribed remodeling of lymphatic vasculature in adult apelin-KO mice.

Lymphatic hyperplasia in apelin deficient mice is associated to a proinflammatory condition

The lymphatic vasculature provides local information by facilitating the trafficking of immune cells from tissue to the lymph node. Hyperpermeability and enlarged lymphatic vessels suggest the development of chronic tissue inflammation in apelin-deficient mice. Moreover, lymph node lymphangiogenesis has been extensively described in the context of cancer metastasis even before that tumor spreads to distant organs.^{22, 23} Here, we analyzed the lymphatic vasculature in apelin-KO mice lymph nodes. Interestingly, apelin-KO mice have an expanded lymphatic network within inguinal and mesenteric lymph nodes, thus indicating the presence of a pro-inflammatory status (Figure 2A). In some case, we noted an increase in the diameter of lymph nodes in apelin-deficient mice (data not shown). We next used flow cytometry analysis to assess the distribution of immune cells population in apelin-KO mice compared to control mice. Although we did not observe any change in the ratio of CD45+CD3+ T cells (online Figure 1), we found a consistent increase in the amount of CD45+CD19+ B cells in apelin-KO ($23.3\% \pm 2.4$) compared to control mice ($14.3\% \pm 1.7$) (Figure 2B). In addition, the ratio of CD45+CD11b+CD206+ macrophages was reduced in correlation with an increase of CD45+CD11b+CD206- M1-like macrophage subset in apelin-KO mice (Figure 2C).

Our data indicate a change in macrophage population towards a M1-like pro-inflammatory phenotype in apelin-KO mice (online Figure 1). Similarly, we observed a slight increase but significant in CD11c population in apelin-KO mice ($7\% \pm 0.42$) compared to control mice ($4.6\% \pm 0.36$) (online table I). Interestingly, macrophage population positive for CD45, CD11b, and LYVE-1 decreased in apelin-KO to $28.5\% \pm 1.8$ compared to control ($40.9\% \pm 2.32$). LYVE-1+ macrophages often located close to the lymphatic vasculature has been shown to play an important role in the morphogenesis and remodelling of the lymphatic vasculature.²⁴ Taken together, our data support the idea of an important role of apelin in the maintenance of anti-inflammatory status. Inversely, an imbalance of apelin level may favour the development of a proinflammatory condition associated to enlarged and dysfunctional lymphatic network.

Early phase of myocardial infarction promotes dilation of lymphatic vessels similar to apelin-KO mice

Cardiac lymphangiogenesis has recently been reported in myocardial infarction.^{1, 2} However, a role of apelin acting on lymphatic endothelium in cardiac ischemia has not been explored previously. To address this issue, we first analyzed by RT-qPCR the expression of apelin/APJ signaling and the expression of lymphangiogenic factors VEGF-C/D and their receptor VEGFR3 at different days after myocardial infarction (Figure 3A and 3B). We noted a striking expression of apelin 2 days post-MI whereas the level of the receptor APJ increased at long-term post-MI as previously reported¹⁶, suggesting an activation of the

apelin/APJ signaling in early days through the reparative phase of MI. As expected, VEGF-C and VEGF-D expression was not induced 2 days post-MI but progressively increased from 1 week to 4 weeks post-MI suggesting the stimulation of lymphangiogenesis at a later stage of MI (Figure 3B). The increase of VEGFR3 at 2 days post-MI (Figure 3B) may correlate with its critical role in adaptive and innate immunity. Indeed, infiltration of immune cells and edema are hallmarks of early stage of myocardial infarction. Therefore, we investigated the phenotype of lymphatic vasculature by immunostaining using LYVE-1 and CD31 antibodies 4 days post-MI. Remarkably, we observed the presence of enlarged and hyperplastic lymphatic vessels in the sub-epicardium close to the peri-infarct or within the infarct zone (Figure 3C). In contrast, lymphatic density was not modified suggesting a sudden adaptation of lymphatic vessels to edema in response to heart injury. We have previously demonstrated that apelin is crucial in the maintenance of a functional lymphatic vasculature. Thus, we reasoned that the lack of apelin may severely impair lymphatic system post-MI. We found that cardiac lymphatic vessels in apelin deficient mice exhibit dilated morphology as observed in control mice (Figure 3D). We next compared the area of lymphatic vessels in apelin deficient mice versus control with or without myocardial infarction. We found that the hyperdilated basal network of lymphatic vessels in apelin-KO mice is comparable to the one observed in control mice with myocardial infarction (Figure 3E). This dilation is not increased in apelin-deficient mice post-MI probably due to the maximum capacity of lymphatic vessels reached in apelin-KO mice (Figure 3E). Acute myocardial infarction induces an increase in lethality in apelin-KO that prevented us to further analyze the consequence of the absence of apelin on lymphatic vasculature. Taken together, our data indicate that lymphatic vasculature rapidly responds to myocardial edema in early days post-MI.

Activated cardiac LEC express apelin and its receptor APJ

We found that the level of APJ increases in chronic phase of myocardial infarction (Figure 4A). Thus, we hypothesized that apelin/APJ specifically signals on LEC during cardiac ischemia. We first performed an immunohistochemical analysis of apelin and APJ expression on cardiac LEC. Although no detection was found on quiescent cardiac lymphatics vessels (Figure 4A) or early days post-MI (data not shown), we visualized the localization of the receptor APJ on activated lymphatic vessels 6 weeks post-MI (Figure 4A). Similarly, the apelin expression was partially associated with cardiac lymphatic vessels in post-MI heart (Figure 4A). Importantly, APJ was only observed in the growing lymphatic vessels within the infarct zone, suggesting a specific role of apelin/APJ signaling in stress conditions. Consistently, we observed an heterogeneity in APJ expression on lymphatic endothelium: only a subset of cells forming lymphatic vessels expressed APJ (online Figure 2). Therefore, we conclude that the APJ receptor is strongly regulated spatially and temporally on activated lymphatic endothelium. We also studied isolated cardiac LEC from mice heart to define the molecular signature of lymphatic endothelium associated to cardiac remodeling. The entire heart, except for the atrium, was taken for analysis (Figure 4B). We defined LEC in wild-type

adult heart as CD45-CD31+Lyve-1+ by cytometry analysis. LEC represented 3.2% of the CD45-CD31+ populations whereas 96.7% are blood endothelial cells (Figure 4C). We confirmed the identity of cardiac LEC by the expression of lymphatic markers Lyve-1, Prox-1, podoplanin as well as VEGFR3 by RT-qPCR compared to BEC (Figure 4D). Similar analysis was performed in isolated LEC from ischemic heart compared to sham mice. Although apelin level is unchanged in both conditions, we detected a low but significant increase of the receptor APJ expression in isolated LEC post-MI suggesting a paracrine function of apelin on the cardiac LEC post-MI. The lymphangiogenic receptor CXCR4 is also upregulated indicating an activation of the lymphangiogenesis process at 6 weeks post-MI. Interestingly, inflammatory markers ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 were not upregulated, however, we noted the expression of the chemokine-scavenging receptor D6 (Figure 4E) suggesting a protective response of lymphatic vasculature in limiting inflammation and/or drainage congestion. Taken together, our data documents a role of Apelin/APJ signaling on newly formed lymphatic vessels that undergoes hypoxic stress.

Myocardial infarction induces a long-term dysfunctional lymphatic network

To better examine the lymphatic remodeling during the chronic phase of myocardial infarction, we next visualized the lymphatic vasculature with LYVE-1 immunostaining on wholemount heart 2 weeks and 6 weeks post-MI. We rapidly observed after 2 weeks a necrotic area in the left ventricle corresponding to the ischemic zone associated with a rarefaction of the lymphatic system in the edge of the infarcted area, whereas the right ventricle lymphatic system was not affected (Figure 5A). After 6 weeks, the left ventricular wall thickness was increased due to cardiac remodeling. We found a strong lymphangiogenesis process with disorganized and abnormal vessel morphology in infarcted zone. Surprisingly, the growth of large lymphatic vessels extends throughout the right ventricle indicating a strong response of the lymphatic vasculature in subepicardial surface of the heart beyond the ischemic zone (Figure 5A). Moreover, we examined in more details the remodeling of lymphatic vasculature by bi-photon microscopy using LYVE-1 immunostaining associated to the second harmonic generation to observe the arrangement of collagen fiber (Figure 5B). Two weeks post-MI, disrupted lymphatic vessels were observed close to the infarcted zone while lymphatic vessels in ventral part were unaffected and associated with distinct collagen fibers (Figure 2B, left panels). At 6 weeks post-MI, the lymphatic network was deconstructed with large, dysfunctional and hyperplastic lymphatic vessels associated with disorganized collagen fibers (Figure 5B, right panels; online Figure 3). This information are in line with a dysfunctional drainage of lymphatic vessels previously reported in rat model of myocardial infarction.¹

Apelin prevents adverse remodeling of lymphatic network in cardiac ischemia

To further characterize the remodeling of lymphatic vessels post-MI, we performed immunodetection of the lymphatic vessels on cryosections of ischemic heart at 2 weeks and 6 weeks (Figure 6, online table 1). We observed an increase of enlarged lymphatic vessels in the edge of the infarct zone at 2 weeks post-MI that developed through the right and the left periventricular zones at 6 weeks post-MI (Figure 6A, online Figure 4A). At 6 weeks post-MI, we remarkably found that the developing lymphatic vasculature in the infarcted area, positive for VEGFR3 and podoplanin have hyperplastic and disorganized morphology (online Figure 4A and 4B). Moreover, enlarged lymphatic vessels are also observed in the non-infarct zone (Figure 6A, right panels) as previously shown in Figure 5. We found that the cardiac lymphangiogenesis mainly occurred in the epicardium compared to the septum (Figure 6B). Importantly, the dilated lymphatic vessels morphology is maintained to 6 weeks post-MI. These results indicated that long-term heart tissue injury generates the incapacity of lymphatic vessels to return to physiological morphology (Figure 6C and 6D). We next wondered whether apelin could play a beneficial role on lymphatic remodeling in chronic phase of myocardial infarction. To assess *in vivo* the role of apelin/APJ signaling, we generated an apelin-overexpressing lentivector to transduce the myocardium after ischemia (Figure 6E). We found that long-term overexpression of apelin does not improve cardiac function but we measured a consistent decrease in cardiac fibrosis (online Figure 5A and 5B). Interestingly, we did not observe an increase of lymphatic vessels in the border of the infarct zone but rather, a regular non-dilated and well-shaped organization of the lymphatic vasculature (Figure 6E and 6F). The number and the dilation of lymphatic vessels are remarkably decreased suggesting that apelin/APJ signaling promotes the maturation of developing lymphatic vasculature under ischemic stress (Figure 6F and 6G). Taken together, our data shows a beneficial role of apelin on lymphatic vascular repair post-MI.

Apelin maintains lymphatic barrier integrity in hypoxic stress

We next deciphered the molecular mechanism by which apelin controls lymphatic vessel maturation by performing an *in vitro* study on LEC. To determine which apelin isoform is responsive for its biological effect, we incubated LEC with Pyr-apelin-13 and apelin-36. We found that apelin-36 stimulated LEC proliferation to a lesser extent than Pyr-apelin-13 (online Figure 4A). We next performed matrigel assay with a coculture of LEC and H9C2-transduced with apelin. As expected, we observed an induction of branch point formation induced by apelin *in vitro* (online Figure 4B) that confirms the pro-lymphangiogenic action of apelin on LEC. We next investigated whether hypoxic conditions induce apelin expression in primary culture of LEC by RT-qPCR. As expected, we found a upregulation of apelin 25 and the pro-lymphangiogenic receptor CXCR4 26 under hypoxic conditions versus normoxia (Figure 7A). Apelin expression is induced from 8h under hypoxia in LECs (Figure 7B) and we observed the presence of the peptide at the LEC membranes at 24h by immunostaining (Figure 7C

and 7D). As the integrity of the lymphatic endothelium is crucial to its function, we next investigated the consequence of hypoxic stress on the organization of lymphatic cell-cell junction *in vitro*. Surprisingly, hypoxia significantly decreased the abundance of VE-cadherin at cellular junctions in LEC (Figure 7E and 7F). This attenuation of VE-cadherin signal was associated with cortical actin disassembly cytoskeleton (Figure 7E) and a higher permeability of lymphatic endothelium (Figure 7G). Since apelin prevents dilation and hyperplasia of LECs *in vivo* (Figure 6D), we wondered whether apelin modulates LEC permeability *in vitro* under hypoxic conditions. To test this, LEC were transduced either with GFP- or apelin- lentiviral vector and then cultured under hypoxic conditions (Figure 7I). We first confirmed the expression of apelin in transduced LECs (Figure 7L). Interestingly, we found that the permeability of LECs induced by hypoxia was prevented by the presence of apelin (Figure 7J). Taken together, our *in vitro* data highlight a role of apelin on regulating the maintenance of barrier integrity of the lymphatic endothelium during hypoxic stress.

DISCUSSION

Improving the lymphatic network integrity recently emerged as a crucial target for cardiovascular disorders. The principal challenge related to improve lymphatic wall function was to identify bioactive molecule that possesses an inherent reparative ability.

It has been clearly established that VEGF-C/VEGFR3 signaling contributes to lymphatic growth and remodeling of cardiac lymphatic vasculature.^{2, 27} Nevertheless, VEGF-C alone is not sufficient to restore the integrity of the lymphatic endothelium in cardiovascular diseases¹.

As presented in this report, apelin was found to improve lymphatic function in ischemic heart. Apelin-deficient mice suffer from lymphatic hyperpermeability and have abnormal morphology and remodeling defects in dermal and cardiac lymphatic vasculature. This phenotype was previously reported in apelin-KO mice fed with high fat diet.¹⁴ Here, we found that the cardiac lymphatic vessel dilation in basal condition was observed mainly at the sub-epicardial surface of the heart. This finding points to the clinical importance of this superficial lymphatic network to limit cardiac interstitial edema and remove protein-rich lymph and tissue metabolites from the myocardium to maintain heart function. Also enlargement of lymphatic vessel in apelin-KO mice was related to an increase of basal inflammation that suggests a defect of lymphatic barrier in protecting from edema and immune cell trafficking. These observations are in accordance with previous literature showing that apelin has an anti-inflammatory action.²⁸ In turn, higher permeability of lymphatic vessels may account into the development of the pro-inflammatory condition in apelin-deficient mice.

The observation that improvement of the cardiac lymphatic network post-MI requires apelin was first derived from the finding that the presence of the receptor APJ was only detected on

activated lymphatic endothelium in ischemic heart whereas no expression was found on quiescent vessels. Although apelin/APJ seems not to be required in lymphatic development, our results highlight a restrictive role of apelin/APJ during pathological lymphangiogenesis in myocardial infarction. Previous studies highlight a strict spatiotemporal regulation of apelin/APJ during blood development. In retina, apelin is strongly upregulated in the tips cells of developing blood vessels while the expression of the receptor APJ is mainly observed in stalk cells during vessels remodeling.^{29, 30} Here, we show heterogeneous expression of APJ on activated LEC indicating that APJ is tightly regulated during lymphatic growth. In light with the literature, we hypothesized that APJ is required on activated lymphatic endothelium but its expression may be downregulated on stabilized lymphatic endothelium. Hypoxia induces a strong expression of apelin in cardiomyocytes *in vivo* and *in vitro*²⁰. Although LECs are capable of producing apelin under hypoxic conditions *in vitro*, our *in vivo* data on isolated LECs show a low induction of apelin expression level. Considering that we could not exclude the importance of cardiomyocytes as a potent source of apelin in heart, our data argue for a paracrine effect of apelin on lymphatic endothelium.

Despite recent studies showing that the lymphatic system plays a crucial role in cardiac function in myocardial infarction^{1, 2}, the heart lymphatic network is still poorly described. Remodelling of lymphatic system has recently been proposed to participate to edema and tissue fibrosis in myocardial infarction.^{1, 31} Lymphangiogenesis has been reported to occur as early as 4 days post-MI.² However, our results show a strong response to lymphatic endothelium to edema with dilation of lymphatic vasculature rather than lymphangiogenic process in early days post-MI. Then, lymphangiogenesis occurs in the periphery of the ischemic zone 2 weeks post-MI and extends to the right ventricle 6 weeks post-MI. Growing lymphatic vessels are associated to disrupted collagen fiber in the ischemic area that confers to newly formed lymphatic vessels an hyperplastic and abnormal morphology. This anarchic disposition of lymphatic vessels correlates with a defect in lymphatic endothelial cell junctions, which in turn promotes the development of dysfunctional vessels.¹ This argument is strengthened when considering that *in vitro* hypoxia induced a diminution of VE-cadherin recruitment and disorganization of cortical actin on LEC suggesting defective junctional and mechanical properties under hypoxic stress. We determined that apelin overexpression was able to restore LEC monolayer integrity by reducing endothelial permeability. Here, we provide evidence that apelin is able to maintain the junctional integrity of lymphatic endothelium in hypoxic stress.

Our observation that apelin improves the cardiac lymphatic system post-MI supports the belief that targeting lymphatic wall integrity is the key to improve cardiac tissue homeostasis. Recent work in the laboratory has demonstrated that hypoxia could also promote VEGF-C synthesis to maintain lymphatic function under stress condition.³² In regard to these

observations, we could propose a combination of VEGF-C and apelin to regulate lymphatic integrity in ischemic disorders.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks go to the Inserm US006 platform ANEXPLO Genotoul (Toulouse, France), Victorine Douin for help and advice on LEC isolation, Christiane Pecher and Alexia Zakaroff-Girard for the cytometry platform (TRI-genotoul, Toulouse), Madjid Zanoun and Danièle Daviaud from the cell Imagery platform (TRI-genotoul, Toulouse), J.J. Maoret and F. Martin GeT platform Genotoul (Toulouse),

SOURCE OF FUNDING

This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Région Midi-Pyrénées. F.T. had a fellowship from ARC. E.R.G. had a fellowship from AFM-Telethon. F.H. had fellowships from the Région Midi-Pyrénées and from the Ligue Nationale Contre le Cancer, A.C.G from the Ligue Nationale Contre le Cancer.

DISCLOSURE

None

REFERENCES

1. Henri O, Pouehe C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Levy F, Henry JP, Dumesnil A, Boukhalfa I, Banquet S, Schapman D, Thuillez C, Richard V, Mulder P and Brakenhielm E. Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation*. 2016;133:1484-97; discussion 1497.
2. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dube KN, Bollini S, Matsuzaki F, Carr CA and Riley PR. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature*. 2015;522:62-7.
3. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K and Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98:2800-4.
4. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, Botker HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B, Thuesen L, Blomberg P, Gyongyosi M, Sylven C and Euroinject One G. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:982-8.
5. Tammela T, Saaristo A, Holopainen T, Lyytikka J, Kotronen A, Pitkonen M, Abo-Ramadan U, Yla-Herttuala S, Petrova TV and Alitalo K. Therapeutic differentiation and maturation of lymphatic vessels after lymph node dissection and transplantation. *Nat Med*. 2007;13:1458-66.

6. D'Alessio S, Correale C, Tacconi C, Gandelli A, Pietrogrande G, Vetrano S, Genua M, Arena V, Spinelli A, Peyrin-Biroulet L, Fiocchi C and Danese S. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 2014;124:3863-78.
7. Cui Y, Liu K, Monzon-Medina ME, Padera RF, Wang H, George G, Toprak D, Abdelnour E, D'Agostino E, Goldberg HJ, Perrella MA, Forteza RM, Rosas IO, Visner G and El-Chemaly S. Therapeutic lymphangiogenesis ameliorates established acute lung allograft rejection. *J Clin Invest.* 2015;125:4255-68.
8. Yang P, Maguire JJ and Davenport AP. Apelin, Elabela/Toddler, and biased agonists as novel therapeutic agents in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36:560-7.
9. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R and Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 2008;27:522-34.
10. Kidoya H, Naito H and Takakura N. Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood.* 2010;115:3166-74.
11. Kim JD, Kang Y, Kim J, Papangelis I, Kang H, Wu J, Park H, Nadelmann E, Rockson SG, Chun HJ and Jin SW. Essential role of Apelin signaling during lymphatic development in zebrafish. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:338-45.
12. Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Yamakawa D, Jia W, Ikawa M, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shirai M, Adams RH, Fukamizu A and Takakura N. APJ Regulates Parallel Alignment of Arteries and Veins in the Skin. *Dev Cell.* 2015;33:247-59.
13. Berta J, Hoda MA, Laszlo V, Rozsas A, Garay T, Torok S, Grusch M, Berger W, Paku S, Renyi-Vamos F, Masri B, Tovari J, Groger M, Klepetko W, Hegedus B and Dome B. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget.* 2014;5:4426-37.
14. Sawane M, Kajiya K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F and Takakura N. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes.* 2013;62:1970-80.
15. Scimia MC, Hurtado C, Ray S, Metzler S, Wei K, Wang J, Woods CE, Purcell NH, Catalucci D, Akasaka T, Bueno OF, Vlasuk GP, Kaliman P, Bodmer R, Smith LH, Ashley E, Mercola M, Brown JH and Ruiz-Lozano P. APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature.* 2012;488:394-8.
16. Tempel D, de Boer M, van Deel ED, Haasdijk RA, Duncker DJ, Cheng C, Schulte-Merker S and Duckers HJ. Apelin enhances cardiac neovascularization after myocardial infarction by recruiting aplnr+ circulating cells. *Circ Res.* 2012;111:585-98.
17. Li L, Zeng H and Chen JX. Apelin-13 increases myocardial progenitor cells and improves repair postmyocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303:H605-18.
18. Wang W, McKinnie SM, Patel VB, Haddad G, Wang Z, Zhabyeyev P, Das SK, Basu R, McLean B, Kandam V, Penninger JM, Kassiri Z, Vederas JC, Murray AG and Oudit GY. Loss of Apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic Apelin analogues. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000249.

19. Sato T, Suzuki T, Watanabe H, Kadowaki A, Fukamizu A, Liu PP, Kimura A, Ito H, Penninger JM, Imai Y and Kuba K. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *J Clin Invest*. 2013;123:5203-11.
20. Ronkainen VP, Ronkainen JJ, Hanninen SL, Leskinen H, Ruas JL, Pereira T, Poellinger L, Vuolteenaho O and Tavi P. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J*. 2007;21:1821-30.
21. Picault FX, Chaves-Almagro C, Progetti F, Prats H, Masri B and Audigier Y. Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. *Eur J Cancer*. 2014;50:663-74.
22. Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Schmid MC, Foubert P, Ellies LG, Barnes L, Feral C, Papayannopoulou T, Lowy A, Blair SL, Cheresh D, Ginsberg M and Varner JA. Integrin alpha4beta1 signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cancer Res*. 2010;70:3042-51.
23. Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Desgrosellier JS, Schmid MC, Foubert P, Ellies LG, Lowy AM, Blair SL, Vandenberg SR, Datnow B, Wang HY, Cheresh DA and Varner J. PI3Kalpha activates integrin alpha4beta1 to establish a metastatic niche in lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:9042-7.
24. Gordon EJ, Rao S, Pollard JW, Nutt SL, Lang RA and Harvey NL. Macrophages define dermal lymphatic vessel calibre during development by regulating lymphatic endothelial cell proliferation. *Development*. 2010;137:3899-910.
25. Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F and Soubrier F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res*. 2008;103:432-40.
26. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, Bernasconi S, Sacconi S, Nebuloni M, Vago L, Mantovani A, Melillo G and Sica A. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med*. 2003;198:1391-402.
27. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Yla-Herttuala S and Alitalo K. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med*. 2001;7:199-205.
28. Sawane M, Kidoya H, Muramatsu F, Takakura N and Kajiya K. Apelin attenuates UVB-induced edema and inflammation by promoting vessel function. *Am J Pathol*. 2011;179:2691-7.
29. Saint-Geniez M, Masri B, Malecaze F, Knibiehler B and Audigier Y. Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech Dev*. 2002;110:183-6.
30. Papangelis I, Kim J, Maier I, Park S, Lee A, Kang Y, Tanaka K, Khan OF, Ju H, Kojima Y, Red-Horse K, Anderson DG, Siekmann AF and Chun HJ. MicroRNA 139-5p coordinates APLNR-CXCR4 crosstalk during vascular maturation. *Nat Commun*. 2016;7:11268.
31. Loukas M, Abel N, Tubbs RS, Grabska J, Birungi J and Anderson RH. The cardiac lymphatic system. *Clin Anat*. 2011;24:684-91.
32. Morfisse F, Kuchnio A, Frainay C, Gomez-Brouchet A, Delisle MB, Marzi S, Helfer AC, Hantelys F, Pujol F, Guillermet-Guibert J, Bousquet C, Dewerchin M, Pyronnet S, Prats AC, Carmeliet P and Garmy-Susini B. Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1alpha-independent translation-mediated mechanism. *Cell Rep*. 2014;6:155-67.

Figures and Figure legends

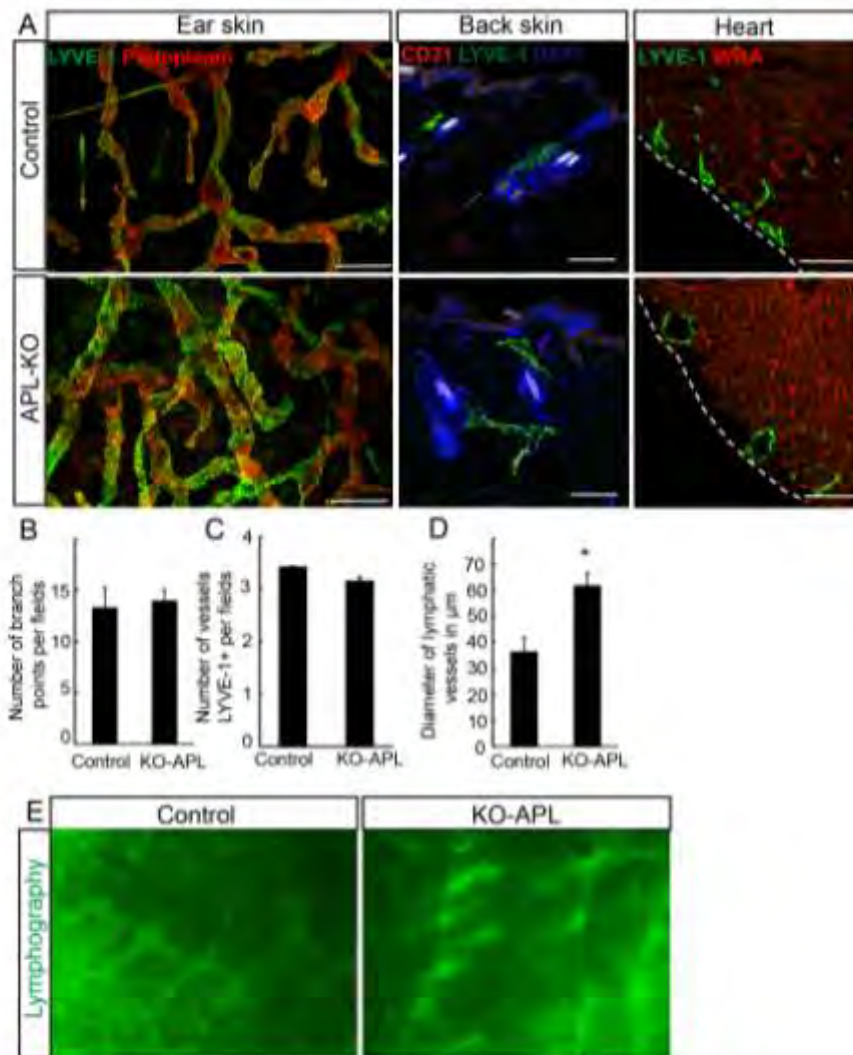


Figure 1: Abnormal lymphatic vasculature in apelin-KO mice. **A**, Analysis of dermal and cardiac lymphatic vasculature in apelin-KO versus control mice. Dilated lymphatic vessels were found in dermal skin and the sub-epicardium surface of the heart of adult apelin-KO mice. **B**, Quantitative evaluation of the number of branch points in ear dermal skin. **C**, Quantification of the number of lymphatic vessels per fields in dermal back skin **D**, quantification of the diameter of lymphatic vessels in adult dermal skin of apelin-KO mice. (n= 5-6 per group, values are means \pm SD; *P<0.001). **E**, Visualization of altered lymphatic drainage in adult skin of apelin-KO compared to control. Scale bar; 100 μ m (A) except ear skin 200 μ m.

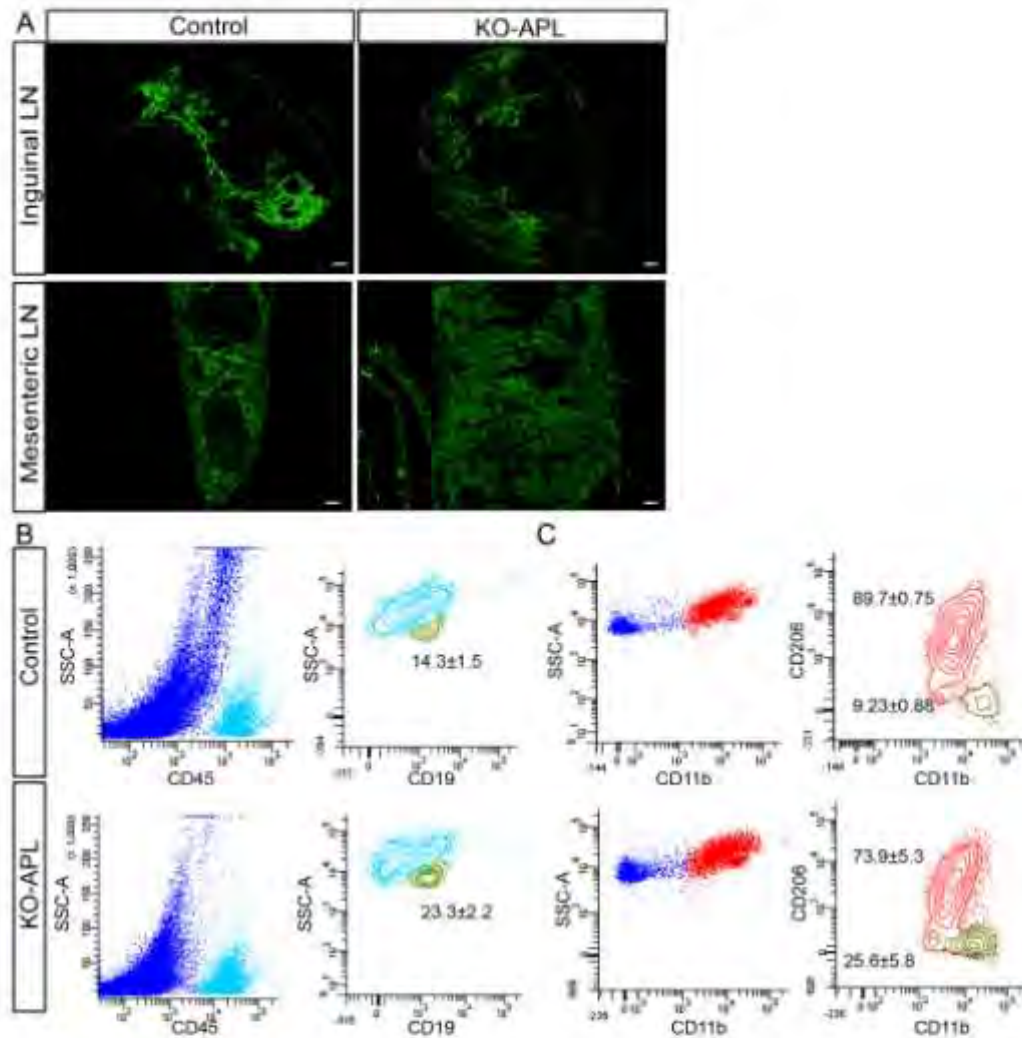


Figure 2: Apelin-KO mice develop a pro-inflammatory status. **A**, Representative images of inguinal and mesenteric lymph nodes with LYVE-1 immunostaining showing an important lymphangiogenic process in apelin-KO mice compared to control. **B**, Representative panels of flow cytometry analysis on heart tissue showing the CD45+CD19+ population in apelin-KO mice compared to control. Note the increase of CD19+ B lymphocytes in apelin-KO mice (n= 3 to 4 per group, % of CD45 positive cells ±SEM are shown, P<0.05). **C**, Representative flow cytometry analysis on heart showing the increase of CD11b+CD206- in apelin-KO mice versus control (n= 3 to 4 per group, % of CD11b positive cells ±SEM are shown, P<0.05). Scale bar: 100µm

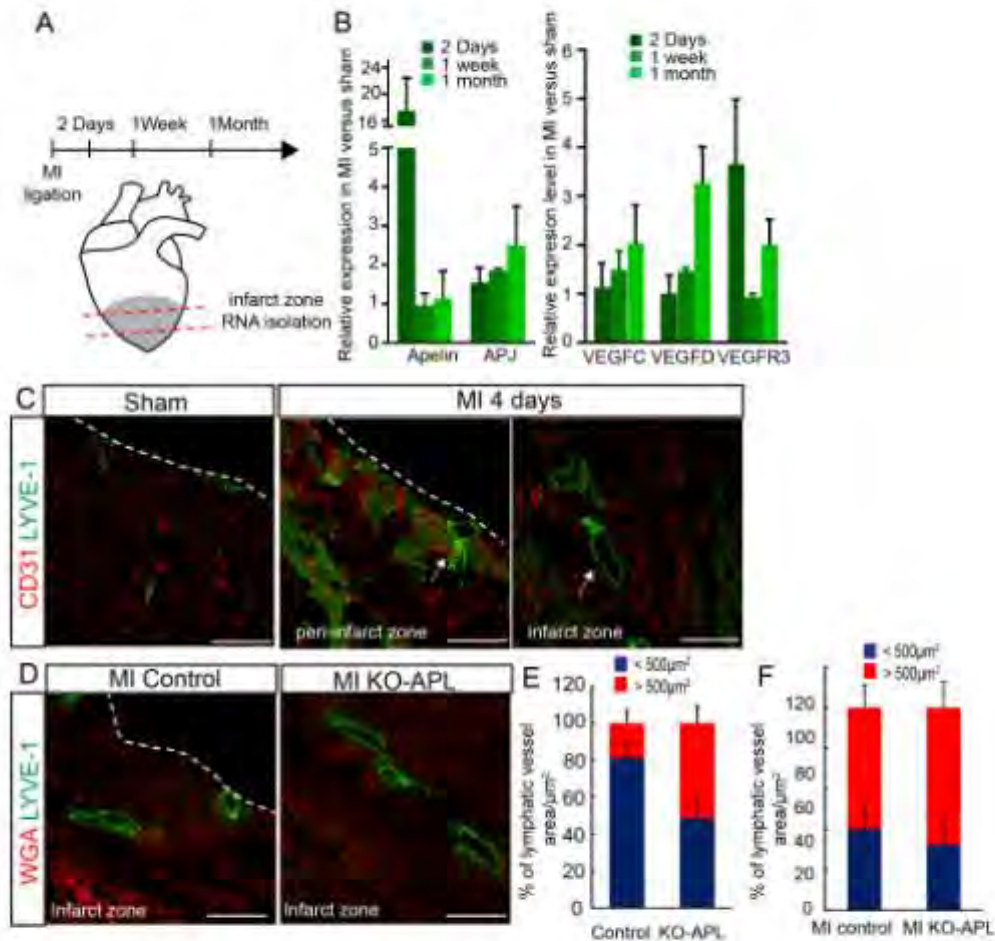


Figure 3: Hyperplastic and dilated lymphatic vessels in early response to myocardial infarction. **A**, Schematic representative of RNA isolation at the infarcted zone at different time point. **B**, Expression of Apelin/APJ signaling and lymphangiogenic factors VEGF-C, VEGF-D and the receptor VEGFR3 at different time post-MI were analyzed by RT-qPCR. **C**, Lymphatic remodeling 4 days post-MI examined by LYVE-1 and CD31 immunostaining showing highly dilated and hyperplastic lymphatic in the peri-infarct and infarct zone. **D**, Remodeling of lymphatic vasculature in apelin-KO mice 4 days post-MI compared to control MI. We observed the presence of dilated lymphatic vessels in all the subepicardial region of the heart in apelin-KO mice. **E**, Quantification of the area of lymphatic vessels in control and apelin-KO mice. The area of all lymphatic vessels located to the subepicardial surface were measured ($n=4$ per group; values are $\% \pm \text{SD}$; $*P<0.004$). **F**, Quantification of the lymphatic vessels area in control and apelin-KO mice. The area of all lymphatic vessels located to the subepicardial surface were measured ($n=4$ per group; values are $\% \pm \text{SD}$). Scale bar: 100 μm (C, D)

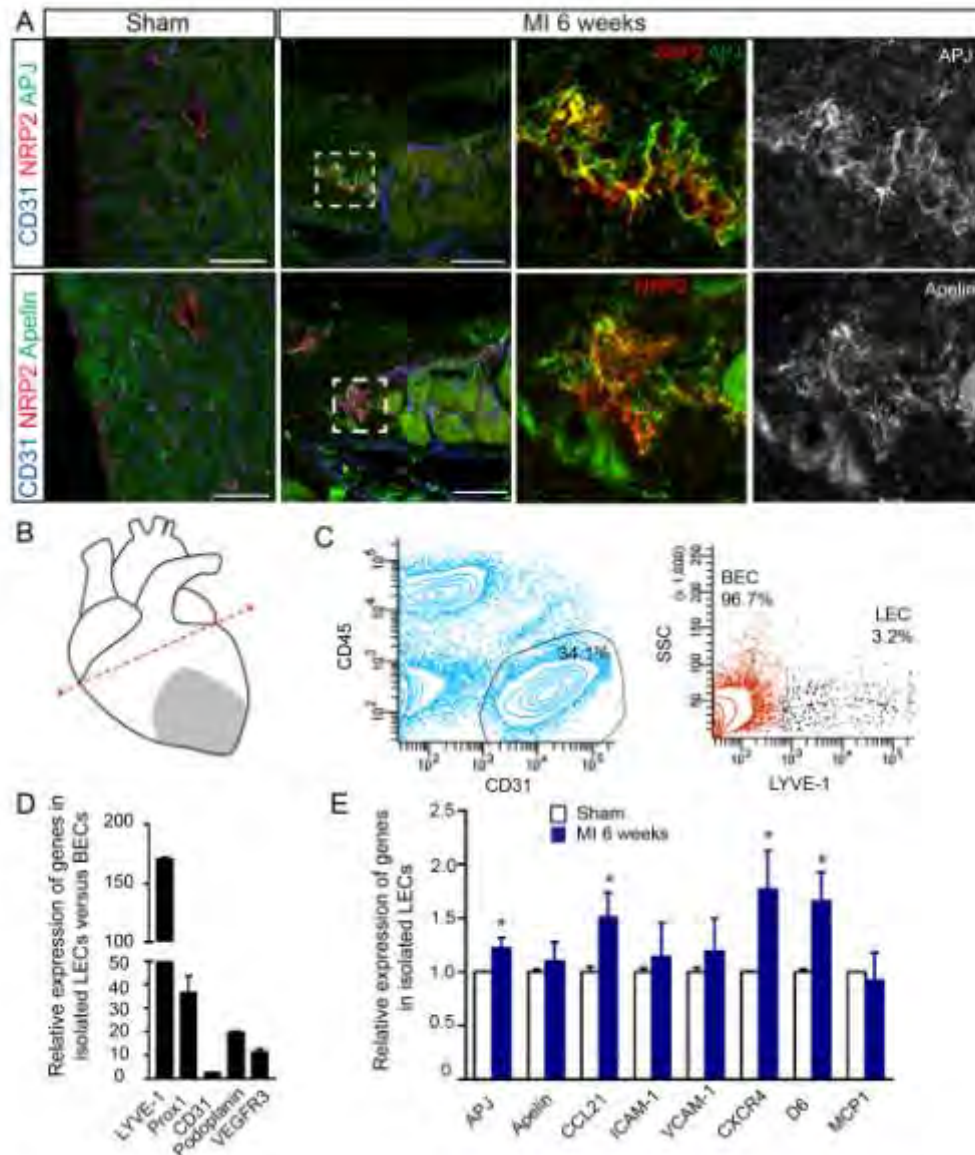


Figure 4: APJ receptor is expressed on activated lymphatic endothelium in ischemic zone. **A**, Localization of APJ receptor and apelin on lymphatic endothelium in sham mice or 6 weeks post-MI. Note the partial colocalization with apelin and NRP2 positive lymphatic vessels. **B**, Schematic representative of the heart region taken for cell sorting analysis. **C**, Representative panel showing the endothelial cells populations defined as CD45 negative and CD31 positive. LYVE-1 marker allows us to differentiate the lymphatic endothelial cells that represents only 3.2% of all endothelial cells in normal heart. **D**, Expression of known lymphatic markers in isolated cardiac LECs compared to blood ECs on normal heart (9-10 heart were pooled together to sort ECs, experiment was repeat twice). **E**, Gene expression in cardiac isolated LECs from sham mice or 6 weeks post-MI. Note the expression of pro-lymphangiogenic receptor APJ and CXCR4, and the expression of inflammatory mediators such as CCL21 and D6. (9-10 heart were pooled together to sort ECs, experiment were repeat twice for each group). Scale bar: 50µm (A)

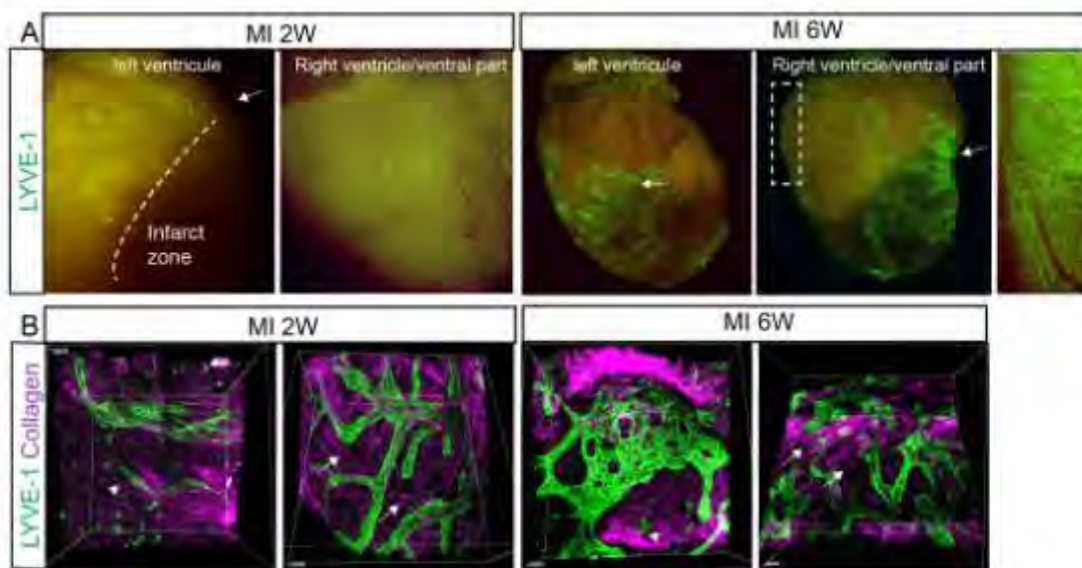


Figure 5: Chronic myocardial ischemia induces abnormal lymphangiogenic remodeling. **A**, Visualization of epicardial lymphatic vasculature by wholemount heart immunostaining with LYVE-1 antibody 2 weeks or 6 weeks post- MI. Dotted line indicated the limit of infarcted zone. Note the important remodeling of lymphatic vasculature that extend beyond the infarcted zone. Arrows indicated the position of the ligation. **B**, Bi-photon microscopy analysis of epicardial lymphatic vessels. 2 weeks post-MI, lymphatic network is disrupted and associated with disordered collagen fibers (arrowheads) close to the infarcted zone while the lymphatic network on the ventral part is not affected. Note the presence of well-organized collagen fiber (arrows). 6 weeks post-MI, we showed a strong disorganized and hyperplastic lymphatic network near the infarct zone that propagates to the opposite side of MI.

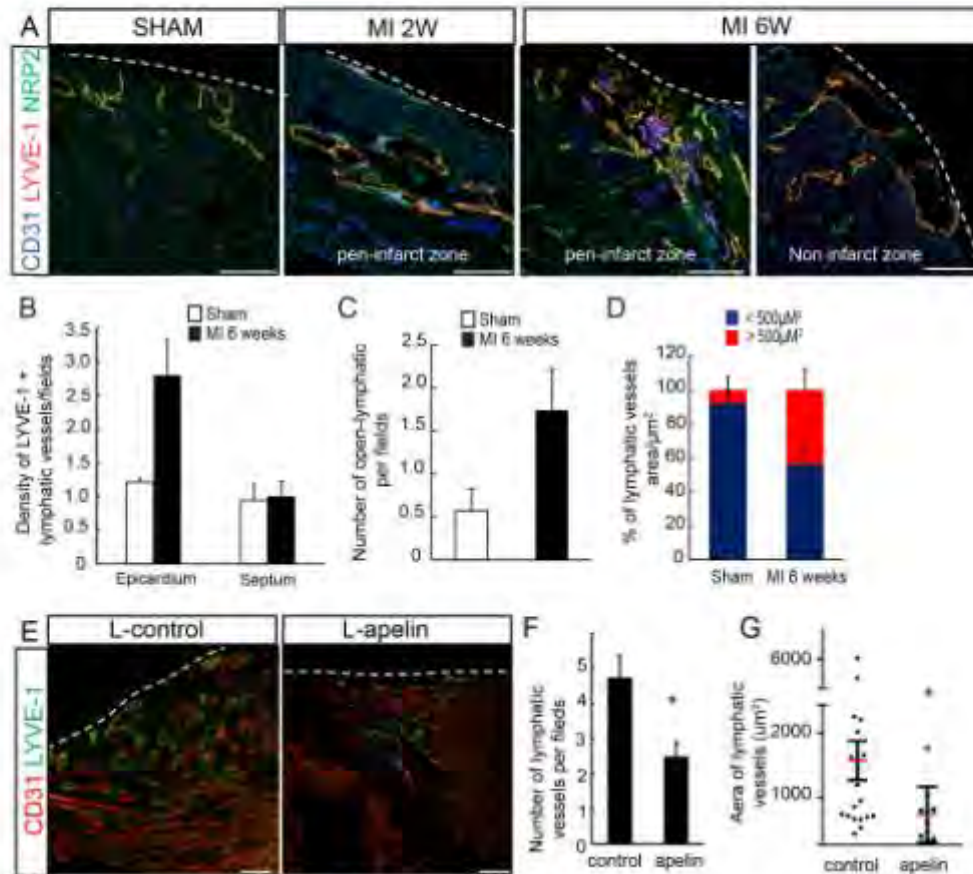


Figure 6: Apelin prevents alteration of lymphatic vasculature under ischemic stress. **A**, Representative images of heart cross-section stained for LYVE-1, NRP2 and CD31 showing the remodeling of lymphatic vasculature post-MI. Enlarged lymphatic vessels appears at the border of infarct zone at 2 weeks post-MI. Note that at 6 weeks post-MI dilated vessels are also present at distance in the non-infarct zone. **C**, LYVE-1 positive vessels density in the sub-epicardium and septum (n=5-6). **D**, Number of open-lymphatic vessels per fields in sham and 6 weeks post-MI (n=5-6). **E**, Area of lymphatic vessels expressed as % of vessels < or > 500μm² (n=5-6). Visualization of lymphatic vasculature in the chronic phase of heart ischemia expressing lentivector apelin or control. Mice treated with apelin-lentivector have a lymphatic vasculature similar to sham mice compared to hyperplastic and highly dilated vessels observed in mice treated with control-lentivector. **F**, Lymphatic vessel density at the border of the infarct zone treated with apelin-lentivector or lentivector control (values are mean ±SD; *P<0.01). **G**, Area of lymphatic vessels at the border of the infarct zone (values are mean ±SD; *P<0.05). Scale bars: 50μm (A), 100μm (E)

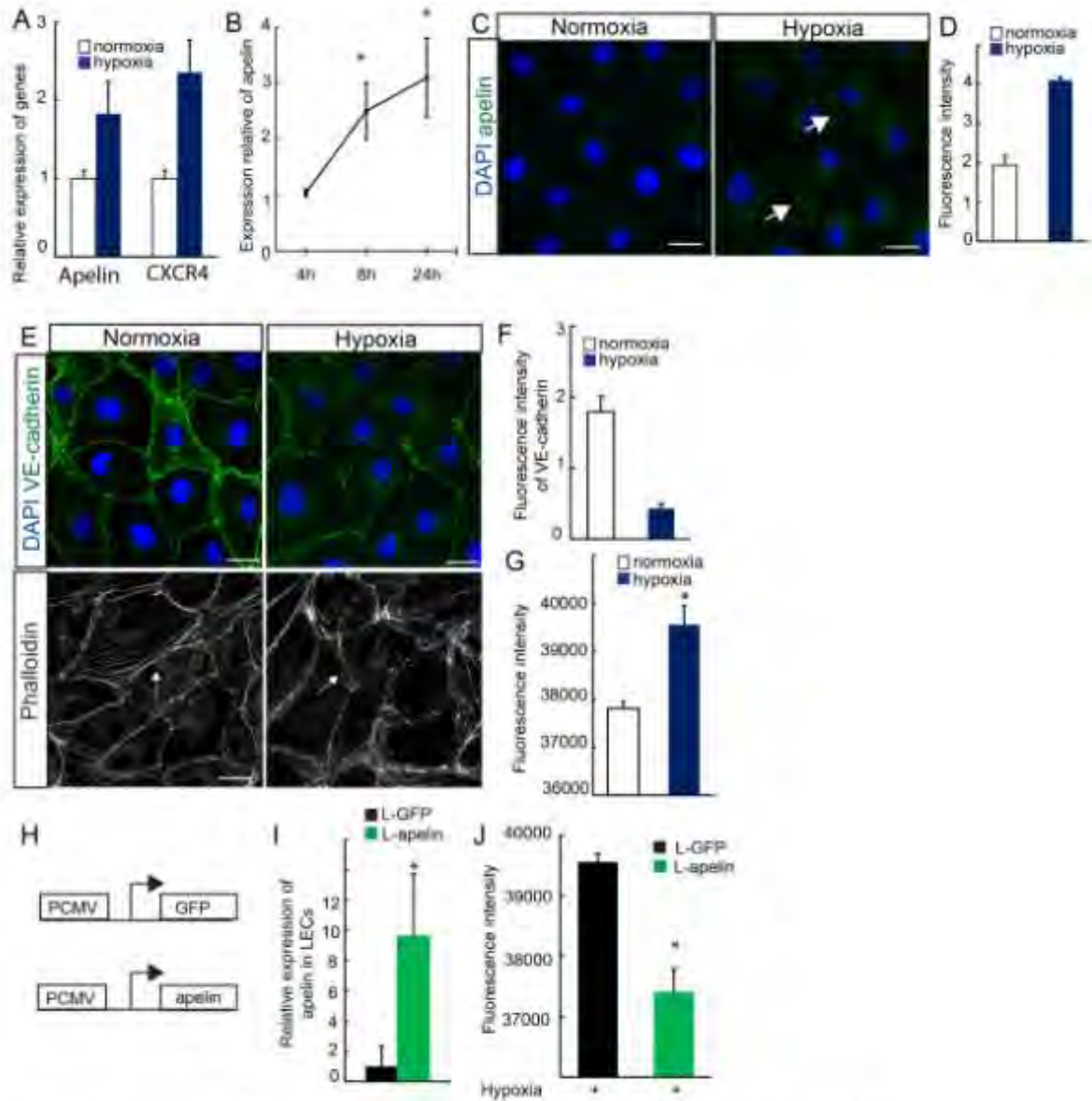


Figure 7: Apelin controls barrier integrity of the lymphatic endothelium *in vitro*. **A**, expression of lymphangiogenic factors under hypoxic stress *in vitro* in LECs compared to normoxia. (n=3 independent samples per group, *P<0.05) **B**) Time-course of the induction of apelin expression in LECs under hypoxic stress (n=3 independent samples per group, *P<0.05). **C**, Apelin immunostaining in LECs cultured under hypoxia or normoxia condition. We observed an increase of apelin peptide close to the membrane of LECs under hypoxia. **D**, Quantification of apelin expression from images shown in **C** (n=3 different experiments). **E**, Effect of hypoxia on newly formed cell-cell junctions between LECs. We observed a decrease of VE-cadherin recruitment at cell-cell junctions and loss of cortical actin cytoskeleton under hypoxic conditions. **F**, Quantification of VE-cadherin immunostaining from images shown in **E**. (n=3 independent experiments). **G**, Permeability assay with LEC under normoxic or hypoxic conditions (n=3 independent experiments, *p<0.05). **H**, schematic represents lentiviral vector expressing GFP or apelin. **I**, Expression of apelin on LECs transduced by lentiviral vector GFP or apelin (n=3 independent experiments, *p<0.05). **J**, Permeability assay with LEC under hypoxic conditions transduced with GFP or apelin (n=6 independent experiments, *p<0.05). Scale bar: 20µm (**C**, **E**)

